

**Das MATa1 Gen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*:
Untersuchungen der Spleißreaktion und der möglichen Rolle und Funktion
der Introns**

Karl Köhrer

Disbui. München

1988



**Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Das *MATa1* Gen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*:
Untersuchungen der Spleißreaktion und der möglichen Rolle und Funktion
der Introns**

**vorgelegt von Karl Köhrer
am 25.10.1988**

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von Paragraph 12 (3) der Promotionsordnung vom 5.3.1981 von Prof. Dr. E.-L. Winnacker betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.
München, 1988

Karl Köhrer

Dissertation eingereicht am 25.10.1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G.R. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.1988

als Dank an meine Familie
und ganz besonders
meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1985 bis Juli 1988 am Laboratorium für molekulare Biologie - Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München - unter Anleitung von Herrn Dr. Horst Domdey durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Ernst-Ludwig Winnacker möchte ich meinen Dank dafür aussprechen, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, am Münchener Genzentrum zu arbeiten, und daß es möglich war, während dieser Zeit eine Reihe von interessanten Fortbildungsveranstaltungen zu besuchen.

Bei Herrn Dr. Horst Domdey möchte ich mich besonders herzlich bedanken. Sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine stetige Diskussions- und Gesprächsbereitschaft haben mir sehr geholfen. Vor allem die wissenschaftliche Förderung, die er mir während dieser Zeit zukommen ließ, weiß ich sehr zu schätzen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinen Kolleginnen und Kollegen Dorothe Dinkel, Michael Duchêne, Angela Löw-Stadelmüller, Matthias Marget, Andrea Schweizer, Jürgen Thierack, Sandra Thompson-Jäger und Karin Vogel. Sie haben durch unzählige Diskussionen, Gespräche und praktische Hilfen zum Gelingen dieser Arbeit ganz wesentlich beigetragen. Mein Dank gilt auch Dr. Michael Breitenbach, der mir bei vielen genetischen Fragestellungen stets eine große Hilfe war.

Für die persönliche und moralische Unterstützung während der letzten Jahre möchte ich mich besonders herzlich bei Ulrike bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung und Problemstellung	2
3.	Ergebnisse	12
3.1.	Korrektes Spleißen und Spleißkomplexbildung der <i>MATa1</i> Vorläufer-mRNA in vitro erfordern eine Mindestdistanz zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt	12
3.1.1	Klonierung des <i>MATa1</i> Gens in pUC13 und M13mp19	12
3.1.2	Verschiedene in vitro Mutagenesen des <i>MATa1</i> Gens	14
3.1.3	Subklonierung der mutagenisierten <i>MATa1</i> -DNAs in pSP64 Vektoren	16
3.1.4	Spleißanalysen von <i>MATa1</i> Transkripten mit verkürztem ersten Intron	16
3.1.4.1	Erzeugung von Deletionen zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt	18
3.1.4.2	Untersuchungen zur Bildung von Spleißkomplexen	19
3.1.4.3	Nachweis verschiedener Spleißprodukte	22
3.1.5	Vergleich der Spleißreaktion in Extrakten aus α - und α -Zellen	24
3.1.6	Quantitative Analyse der Spleißeffizienz der $\Delta 1$ Mutante	27
3.1.7	Spleißanalysen von <i>MATa1</i> Transkripten mit verkürztem ersten Exon	30
3.1.7.1	Verkürzung des ersten <i>MATa1</i> Exons	30
3.1.7.2	Nachweis der Spleißprodukte	30
3.1.7.3	Untersuchungen zur Bildung von Spleißkomplexen	32
3.1.8	Spleißanalyse eines Transkripts mit einer längen-kompensatorischen Mutation zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt	33
3.1.8.1	Erzeugung der kompensatorischen Mutante 7C	33
3.1.8.2	Analyse der Spleißprodukte	35
3.1.9	Spleißanalyse einer längenkompensatorischen Mutation zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle	36
3.1.9.1	Erzeugung der kompensatorischen Mutante $\Delta 7A$	36
3.1.9.2	Analyse der Spleißprodukte	38
3.1.10	Analyse der Spleißkomplexbildung in einem nativen Gelsystem	39



3.2	Nachweis alternativer Spleißprodukte in vivo und Untersuchungen zu einer möglichen Funktion der Introns	42
3.2.1	Nachweis alternativer <i>MATa1</i> Spleißprodukte in vivo	42
3.2.1.1	Nachweis einer zu der kryptischen 5' Spleißstelle gespleißten <i>MATa1</i> mRNA	42
3.2.1.2	Nachweis einer <i>MATa1</i> mRNA, die durch "exon-skipping" entsteht	43
3.2.2	Analyse chromosomaler <i>MATa1</i> Mutanten	44
3.2.2.1	Erzeugung chromosomaler <i>MATa1</i> Hefemutanten	46
3.2.2.2	Analyse der <i>MATa1</i> RNA aus den verschiedenen Mutanten	50
3.2.2.3	Untersuchungen zur Konjugation	50
3.2.2.4	Untersuchungen zur Sporulation	52
3.2.2.5	Untersuchungen zur Germination	53
4.	Diskussion	56
4.1	In vitro und in vivo Spleißuntersuchungen am <i>MATa1</i> Gen	56
4.1.1	Bestimmung der Minimallänge eines Introns	56
4.1.2	Alternative Spleißreaktionen	61
4.1.3	Zelltypspezifische Spleißreaktionen	62
4.2	Intronfunktion	62
5.	Materialien	65
5.1	<i>E. coli</i> Stämme und Hefestämme	64
5.2	Enzyme und Chemikalien	65
5.3	Oligodeoxynukleotide	68
5.4	DNA Längenstandards und Vektoren	70
5.5	Genbanken	71
5.6	Radiochemikalien	71
5.7	Standardlösungen, Puffer und Medien	72
5.8	Geräte	85
5.9	Andere mikro- und molekularbiologische Hilfsmittel	86
6.	Methoden	87
6.1	Aufzucht und Konservierung von Bakterien- und Hefezellen	87
6.2	Erzeugung diploider Hefezellen durch Konjugation ("mating")	87

6.3	Sporulationsanalysen	88
6.4	Tetradenanalysen	88
6.5	Fällung von Nukleinsäuren	89
6.6	Phenolextraktion von Nukleinsäuren	89
6.7	Reinigung von Oligodeoxynukleotiden	90
6.8	Gelelektrophorese	91
6.8.1	Agarosegele	91
6.8.2	"Low Melting Point"-Agarosegele	91
6.8.3	Agarosegele zum Auftrennen von RNA	91
6.8.4	Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoffgele	92
6.8.5	Native Polyacrylamid-Agarose Mischgele	93
6.9	Plasmidpräparationen aus <i>E. coli</i>	93
6.9.1	Plasmidpräparation aus 200 ml Kulturen	93
6.9.2	Plasmidpräparation aus 1.5 ml Kulturen	94
6.10	Präparation von M13 Einzel- und Doppelstrang-DNA	95
6.11	Präparation von einzelsträngiger pM(a/c)-DNA	96
6.12	Isolierung genomischer Hefe-DNA	96
6.13	Isolierung von Hefe-RNA nach der "Hot-Phenol"-Methode	97
6.14	Anreicherung von Poly(A)+RNA	97
6.15	Restriktionsspaltungen	98
6.16	Isolierung doppelsträngiger DNA-Fragmente	99
6.17	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase	99
6.18	Ligation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten	100
6.18.1	Ligation von isolierten Fragmenten	100
6.18.2	Ligation in "Low Melting Point"-Agarosegelen	101
6.18.3	"shotgun"-Ligationen	101
6.19	Transformationsmethoden	101
6.19.1	Transformation von <i>E. coli</i> K12 Stämmen	101
6.19.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	103
6.20	Transfer von Bakterienkolonien auf Nitrocellulose-Filter	104
6.21	Transfer von Bakteriophagen auf Nitrocellulose-Filter	104
6.22	Southern- und Northern-Blot	105
6.23	Radioaktive Markierung von DNA	106
6.23.1	5' Markierung von Oligodeoxynukleotiden	106
6.23.2	Radioaktive Markierung von dsDNA nach der "Random Hexamer Priming"-Methode	106

6.23.3	Hybridisier- und Waschbedingungen bei Hybridisierungen mit 5'-[³² P]-markierten Oligodeoxynukleotiden	107
6.23.4	Hybridisier- und Waschbedingungen bei Hybridisierungen mit [³² P]-markierten DNA-Fragmenten	107
6.24	Erzeugung von Deletionsmutanten durch kombinierte T4 DNA Polymerase - Mung Bean Nuklease - Klenow Polymerase Behandlung	108
6.25	Gerichtete in vitro Mutagenese mit Hilfe von Oligodeoxynukleotiden	109
6.25.1	In vitro Mutagenese im M13 System	110
6.25.2	"Gapped duplex DNA"-Mutagenese mit pM(a/c)-Vektoren	111
6.26	In vitro Synthese von mRNA-Vorläufermolekülen	112
6.27	Präparation von Hefe-Gesamtzellextrakten für in vitro Spleißanalysen	112
6.28	In vitro Spleißreaktion von Hefe mRNA-Vorläufermolekülen	113
6.29	Primer-Extensions Analysen	114
6.30	Analyse von Spleißkomplexen auf Glyceringradienten	115
6.31	Analyse von Spleißkomplexen auf nativen Polyacrylamid-Agarosegelen	115
6.32	Sequenzierung von Nukleinsäuren	116
6.32.1	Plasmidsequenzierung mit Klenow Polymerase	116
6.32.2	Plasmidsequenzierung mit Sequenase	117
6.32.3	Sequenzierung von einzelsträngiger DNA	118
6.32.4	RNA-Sequenzierung durch Primer-Extension	118
6.33	Identifizierung und Isolierung der DNA positiv hybridisierender λ -Phagen	119
6.33.1	Identifizierung und Isolierung positiv hybridisierender Phagen-DNA aus einer λ EMBL3A Genbank	120
6.33.2	Identifizierung und Isolierung positiv hybridisierender λ -Phagen aus einer λ gt11 Genbank	122
6.34	Computeranalysen	123
7.	Literatur	125
8.	Anhang	136
	Identifizierung und Charakterisierung von RNA-Sequenzen, die mit den MATa1 spezifischen Oligodeoxynukleotiden E2 und E3 kreuzhybridisieren	

8.1	RNA-Sequenzierung mit den Oligodeoxynukleotiden E2 und E3	136
8.2	Sequenzvergleiche mit einer Nukleinsäure-Datenbank	137
8.3	Klonierung und Charakterisierung eines Gens aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit Sequenzhomologie zum ribosomalen Protein S1 aus <i>Xenopus laevis</i>	138
8.3.1	Identifizierung und Isolierung genomischer λ -Klone	138
8.3.2	DNA-Sequenzanalyse des Gens und der flankierenden Regionen	140
8.3.3	Northernblot-Analyse	143
8.3.4	Computeranalyse der DNA- und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz	144

Abkürzungen und Fachausdrücke

A	Amper
AA	Acrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BPB	Bromphenolblau
cDNA	zur RNA komplementärer DNA-Strang
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cpm	Zerfälle pro Minute
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
ddNTP	Dideoxyribonukleosidtriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kbp	Kilobasenpaare
LMP-Agarose	"Low Melting Point"-Agarose
MAT	"mating type"
MES	2(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
Min	Minuten
Na-Acetat	Natriumacetat
NC-Filter	Nitrocellulose-Filter
OD _{xxx}	Optische Dichte gemessen bei xxx nm Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
PAA	Polyacrylamid

PIPES	Piperazin-NN'-bis-2-ethansulfonsäure
PEG	Polyethylenglycol
pfu	"plaque forming unit"
PNK	T4 Polynukleotidkinase
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
RF	replikative Form
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunden
snRNP	small <u>n</u> uclear <u>r</u> ibon <u>n</u> uclear particle
ss	einzelsträngig
Std	Stunden
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Enzymeinheit
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolette Licht
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
XC	Xylencyanol

1. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte aufgrund von in vitro Spleißanalysen nachgewiesen werden, daß der Abstand zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt im Intron des *MATa1* Gens von *Saccharomyces cerevisiae* eine bestimmte Mindestdistanz nicht unterschreiten darf, damit die intervenierende Sequenz korrekt aus der Prä-mRNA herausgeschnitten werden kann.

Eine Verkürzung des Introns um nur ein Nukleotid hatte eine Reduktion der Spleißeffizienz um 60 % zur Folge. Wurde der Abstand zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt um 5 oder 6 Nukleotide verkürzt, so konnte das Intron überhaupt nicht mehr korrekt aus der Vorläufer-mRNA entfernt werden.

In vitro Spleißanalysen von *MATa1* Transkripten, die im Bereich der oben genannten Introndeletionen zum Wildtyp komplementäre Sequenzen enthielten, konnten zeigen, daß die beobachtete Verringerung, bzw. völlige Verhinderung, einer korrekten Spleißreaktion kein sequenzspezifischer sondern längenabhängiger Effekt war.

Durch kompensatorische Längenmutation einer spleißdefekten Intronsequenz, die jedoch alle notwendigen Erkennungssignale besaß, konnte weiterhin belegt werden, daß nicht allein die Gesamtlänge des Introns, sondern vor allem der Abstand zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt entscheidend ist. Wird diese Mindestdistanz unterschritten, so wird bereits der erste Schritt der Spleißreaktion, die Bildung eines "Prä-Spleißkomplexes" aus Prä-mRNA, U1- und U2-snRNPs blockiert.

Durch in vitro Spleißanalysen des *MATa1* Gens konnten außerdem zum ersten Mal alternative Spleißprozesse in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden. Alternative Spleißprodukte des *MATa1* Gens entstehen durch die Benützung einer kryptischen 5' Spleißstelle im ersten Exon und durch "exon-skipping". Eine Analyse von Hefe-Gesamt-RNA zeigte außerdem, daß diese alternativen Spleißprodukte auch in vivo gebildet werden, wobei eine biologische Funktion dieser alternativen Spleißprodukte allerdings fraglich ist.

Durch die Erzeugung chromosomaler *MATa1* Hefemutanten, bei denen entweder ein oder beide Introns im *MATa1* Gⁿ exakt deletiert waren, konnte gezeigt werden, daß die Introns für vegetatives Wachstum, Konjugation, Sporulation und Sporengermination nicht essentiell sind.

Außerdem konnte durch die Insertion einer Suppressor tRNA in das *MATa1* Gen bestätigt werden, daß das *MATa1* Genprodukt für die Sporulation notwendig ist.

2. EINLEITUNG

Die Bier- oder Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird seit Jahrtausenden zur Herstellung von verschiedenen Lebensmitteln benutzt. Dies ist sicher ein Grund dafür, warum die Stoffwechselvorgänge dieser Hefe sehr gut untersucht sind. Auch die Genetik von *Saccharomyces cerevisiae* ist sehr detailliert analysiert worden und trägt dazu bei, daß die Hefe eine immer größere Rolle als Modellsystem für höhere Eukaryonten spielt.

Saccharomyces cerevisiae ist ein einzelliger eukaryontischer Organismus, der während seines Lebenszyklus in drei verschiedenen Zelltypen vorkommen kann (Winge, 1935; Lindegren und Lindegren, 1943). Normalerweise dominiert in der vegetativen Phase der diploide a/ α -Zelltyp. Bei Nährstoffmangel durchläuft die diploide Zelle jedoch die Meiose und es bildet sich ein Ascus mit vier haploiden Ascosporen aus. Von den vier Ascosporen, die Dauerformen darstellen, besitzen je zwei den Zelltyp a bzw. α . Die im Labor benutzten Hefestämme sind in der Regel haploid und heterothallisch (*ho*). Heterothallische Hefezellen halten ihren Zelltyp stabil, so daß alle Tochterzellen den gleichen Zelltyp besitzen wie die Mutterzellen. Homothallische Stämme (*HO*) hingegen können den Zelltyp wechseln (Hawthorne, 1963; Hicks und Herskowitz, 1976; Strathern und Herskowitz, 1979; Takano und Oshima, 1970). Haploide Hefezellen mit unterschiedlichem Zelltyp (a und α) können miteinander konjugieren und so wieder in den diploiden Zustand übergehen (Lindegren und Lindegren, 1943).

Der Generationswechsel von *Saccharomyces cerevisiae* ist nicht nur morphologisch sehr gut untersucht worden, sondern wurde auch mit Hilfe natürlich vorkommender und künstlich erzeugter Mutanten molekularbiologisch näher analysiert. So konnte zum Beispiel der Vorgang des Zelltypwechsels in homothallischen Stämmen einem bestimmten Gen, dem *HO* Gen zugeschrieben werden (Hicks und Herskowitz, 1976; Hicks und Herskowitz, 1977; Strathern und Herskowitz, 1979; Kostriken et al., 1983). Das *HO* Gen, das für eine DNA Endonuklease kodiert (Kostriken und Heffron, 1984), unterliegt einer sehr komplexen Kontrolle, die unter anderem dafür verantwortlich ist, daß das *HO* Gen in diploiden a/ α Zellen inaktiv ist (Jensen et al., 1983). Diese Kontrolle sorgt weiterhin dafür, daß in haploiden homothallischen Stämmen das *HO* Gen nur transient in der G1-Phase aktiv ist (Nasmyth, 1983). Außerdem wird das *HO* Gen nur in Mutterzellen und nicht in Tochterzellen exprimiert, so daß nur Mutterzellen den Zelltyp wechseln können (Strathern und Herskowitz, 1979; Nasmyth, 1987). Die hierfür notwendigen in cis und trans agierenden Elemente wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht (Breedon und Nasmyth, 1987; Miller et al., 1985; Nasmyth, 1985a; Nasmyth, 1985b; Nasmyth, 1987). Man ist mittlerweile in der Lage, die verschiedenen Regulationsmechanismen, denen das *HO* Gen unterliegt, bestimmten 5' gelegenen Sequenzen (URS = Upstream Regulating Sequences) zuzuordnen (Nasmyth, 1985a; Nasmyth, 1985b; Nasmyth und Shore, 1987). Einige Faktoren, die an diese Kontrollregionen des *HO* Gens binden und die *HO* Expression auf diese Weise

regulieren, konnten inzwischen auch identifiziert und charakterisiert werden (Sternberg et al., 1987; Breeden und Nasmyth, 1987).

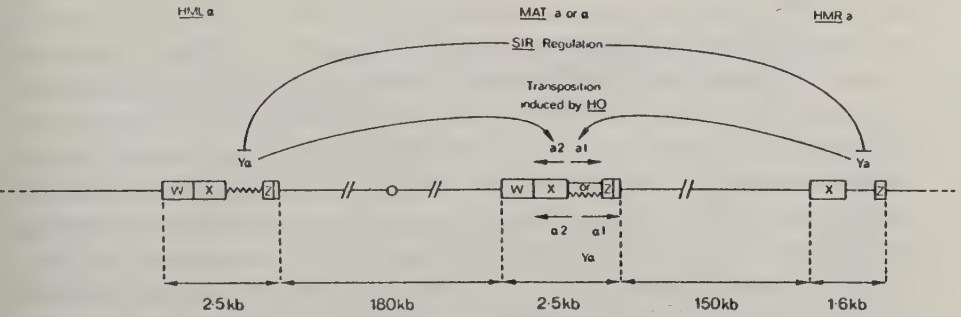


Abb. 1: Organisation der *MAT* Loci auf Chromosom III

Diese Abbildung ist einer Veröffentlichung von K. Nasmyth (1982) entnommen. Erläuterungen dazu finden sich im Text.

Große Fortschritte gab es auch bei Untersuchungen des Hefe *MAT* Locus. Der *MAT* Locus sitzt auf dem rechten Arm von Chromosom III und je nachdem, ob das *a* oder das α Allel vorliegt, besitzt die Hefezelle den *MATa* oder *MAT α* Zelltyp (= mating-type). Neben diesem aktiv transkribierten *MAT* Locus gibt es noch jeweils eine Kopie des *MATa* und des *MAT α* Locus, ebenfalls auf Chromosom III, die jedoch beide transkriptionell inaktiv sind (Nasmyth, 1982; Dranginis, 1986; Herskowitz, 1987). Die Inaktivierung dieser *MATa* und *MAT α* Kopien an diesen sogenannten *HML* und *HMR* Loci erfolgt durch mindestens vier *SIR* Genprodukte (Klar et al., 1981; Nasmyth et al., 1981). Nur durch die Transposition der *HMR*- oder *HML*-Kassette in den *MAT* Locus, werden diese transkriptionell aktiviert, und unterliegen nicht mehr der negativen Expressionskontrolle. Dieser durch das *HO* Gen induzierte Transpositionsvorgang, sowie die schematische Struktur des *MAT*, *HML* und *HMR* Locus ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Die beiden Allele des *MAT* Locus (*MATa* und *MAT α*) unterscheiden sich nur in einem kleinen Teil ihrer DNA-Sequenz. Neben den homologen Bereichen die mit W, X, und Z bezeichnet werden, gibt es die Region Y, in der sich *MATa* und *MAT α* unterscheiden. *MATa* enthält eine 642 bp lange *Ya* Region und *MAT α* enthält eine 747 bp lange *Y α* Region. Von beiden Allelen (*MATa* und *MAT α*) werden jeweils zwei Transkripte von einem bidirektionellen Promotor aus generiert ($a1$ und $a2$, bzw. $\alpha1$ und $\alpha2$), deren Genprodukte letztlich den Zelltyp von *Saccharomyces cerevisiae* bestimmen. Wie diese Genprodukte die drei möglichen Zelltypen ausprägen, wurde von Strathern et al. (1981) in der sogenannten $a1/\alpha2$ -Hypothese vorgeschlagen (siehe Abb. 2). Nach dieser Hypothese werden die *a*-zelltypspezifischen Gene in haploiden *a*-Zellen konstitutiv exprimiert und so der *MATa* Zelltyp aufrechterhalten. In haploiden α -Zellen

werden die α -zelltypspezifischen Gene durch $\alpha 1$ angeschaltet und durch $\alpha 2$ die a-zelltypspezifischen Gene abgeschaltet, was zur Ausprägung des *MAT α* Zelltyps führt. In diploiden Zellen liegen beide Allele, also *MATa* und *MAT α* , vor. In diesen Zellen reprimiert $\alpha 2$ weiterhin die Expression der a-spezifischen Gene und reprimiert außerdem zusammen mit $\alpha 1$ sämtliche haploidspezifischen Gene (wie z. B. *HO*). Zusätzlich werden die diploidspezifischen Gene durch $\alpha 1/\alpha 2$ aktiviert und $\alpha 1$ reprimiert, um die Expression der α -spezifischen Gene zu verhindern. Gerade in den letzten Jahren konnten große Teile dieser Hypothese experimentell bestätigt werden. So konnte zum Beispiel für das *MATa1* Gen eine "helix-turn-helix" Struktur nachgewiesen werden, die für eine Klasse von DNA-bindenden Proteinen charakteristisch ist (Pabo und Sauer, 1984). Für das $\alpha 2$ Genprodukt konnte die sequenzabhängige DNA-Bindung direkt nachgewiesen werden, indem die 32 bp lange DNA-Erkennungssequenz mit einem Indikatorgen verknüpft wurde, und so die $\alpha 2$ -Kontrolle auf die Expression des Markergens übertragen werden konnte (Johnson und Herskowitz, 1985). Ebenso wurde für die Repression haploidspezifischer Gene durch $\alpha 1/\alpha 2$ eine Konsensussequenz für die Erkennungsregion im 5' nichttranskribierten Bereich dieser Gene entdeckt (Miller et al., 1985). Trotz der großen Fortschritte, die auf diesem Gebiet erzielt wurden, bleiben viele Fragen offen, so zum Beispiel welche Rolle das *MATa2* Gen bei der Ausprägung des Zelltyps spielt, oder welche Bedeutung die ungewöhnliche Struktur des *MATa1* Gens hat. Das *MATa1* Gen ist das bisher einzig bekannte Hefegen, das zwei Introns besitzt (Miller, 1984). Interessant erscheint weiterhin, daß im zweiten Intron, welches sehr nahe am 3' Ende des Gens liegt, Homolgien zu homeotischen Genen von *Drosophila* und *Xenopus* auftreten (Shepherd et al., 1984). Inwieweit diese ungewöhnliche Struktur des *MATa1* Gens und insbesondere der Spleißprozeß für die Ausprägung des Hefezelltyps von Bedeutung sind, ist bisher nicht untersucht worden.

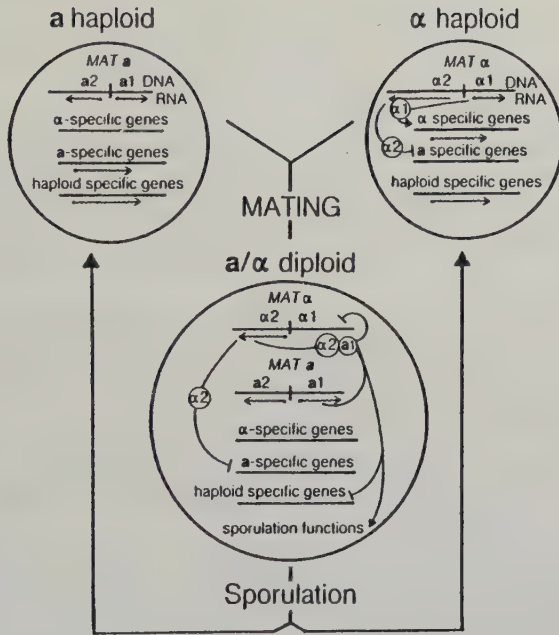


Abb. 2: Schematische Darstellung der $a1/\alpha2$ -Hypothese am Beispiel des Lebenszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*. Diese Abbildung ist dem Übersichtsartikel von A. M. Dranginis (1986) entnommen. Erklärungen dazu finden sich im Text.

RNA Spleißprozesse

Als 1977 die ersten Berichte von intervenierenden Sequenzen (Introns) in viralen Genen (SV40, Adenovirus) und in Genen von höheren Eukaryonten auftauchten (Aloni et al., 1977; Berget et al., 1977; Brack und Tonegawa, 1977; Doel et al., 1977; Jeffreys und Flavell, 1977), ahnte man noch nicht, wie weit verbreitet diskontinuierliche Gene sind. Inzwischen sind bei allen untersuchten Eukaryonten, aber auch bei Archaeobakterien und Bakteriophagen intronhaltige Gene beschrieben worden. Introns gibt es nicht nur in Genen, die für Proteine kodieren, sondern auch in tRNA und rRNA Genen (Abelson, 1979). Die Größe von intervenierenden Sequenzen variiert sehr stark sie können von wenigen Nukleotiden (Intron mit 14 Nukleotiden in der tRNA^{Tyr} von *Saccharomyces cerevisiae*; Olson et al., 1977) bis zu mehreren Kbp (59 Introns mit insgesamt mehr als 200 Kbp im Dystrophingen (DMD), das für die Duchenne Muskel

Dystrophie verantwortlich ist; Koenig et al., 1987) reichen. Die bis dato beschriebenen Introns lassen sich in vier Klassen einteilen (Sharp, 1985):

- 1) Introns in kernkodierten mRNA-Vorläufermolekülen: Diese Intronsequenzen beginnen immer mit GU und enden mit AG (Breathnach et al., 1978).
- 2) Die sog. Gruppe I Introns: Diese werden über einen autokatalytischen Prozeß herausgeschnitten. Hervorstechendes Beispiel hierfür ist das Intron in der 28S ribosomalen RNA von *Tetrahymena thermophila* (Cech et al., 1981; Kruger et al., 1982). Dazu gehören jedoch auch einige Introns mitochondrialer Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* (Burke und RajBhanday, 1982), sowie eines ribosomalen Gens aus *Physarum polycephalum* (Nomiyama et al., 1981).
- 3) Mitochondriale Introns der Gruppe II: Diese werden ebenfalls über einen autokatalytischen Prozeß herausgeschnitten, besitzen jedoch andere Konsensussequenzen als die Introns der Gruppe I (Michel und Dujon, 1983). Zu dieser Gruppe gehören vor allem viele intronhaltige mitochondriale Gene von *Saccharomyces cerevisiae*. Ein besonderes Charakteristikum dieser Gruppe II Introns ist die lassoförmige Struktur des herausgeschnittenen Introns, die bei der Spleißreaktion von Gruppe I Introns nicht auftritt (Horst und Tabak, 1985).
- 4) Introns in tRNA Genen.

Der Spleißmechanismus von kernkodierten mRNA-Vorläufermolekülen und von mitochondrialen Gruppe II Introns scheint sehr ähnlich zu sein, da das gleiche lassoförmige Intermediat (2/3-Molekül) auftritt. Auch ist die sehr ungewöhnliche 2' - 5' Bindung, die zu dem zirkulären Zwischenprodukt führt, in beiden Fällen die gleiche. Einziger Unterschied ist die Art der Katalyse, die im Falle der Gruppe II Introns durch die RNA selbst, und im Falle von kernkodierten mRNA-Vorläufermolekülen in definierten Spleißkomplexen, welche u. a. snRNPs ("small nuclear ribonucleoprotein particles") enthalten, erfolgt. Würde sich jedoch herausstellen, daß die in diesen Spleißkomplexen enthaltenen RNAs (snRNAs, bzw U-RNAs) die Spleißreaktion katalysieren, so würde es prinzipiell keinen Unterschied zwischen diesen beiden Intronklassen geben. In einem Fall würde das katalytische Zentrum durch die Prä-mRNA selbst "intramolekular" zur Verfügung gestellt werden (Gruppe II), und im anderen Fall würde die katalytische Aktivität durch die im snRNP enthaltenen snRNAs "intermolekular" bereitgestellt werden. Ob dies der Fall ist, konnte jedoch bis jetzt noch nicht endgültig beantwortet werden.

Im Hefesystem hat die Analyse dieser Spleißkomplexe in den letzten Jahren besonders große Fortschritte gemacht. So konnte nachgewiesen werden, daß mindestens neun Proteine (RNA2, RNA3, RNA4, RNA5, RNA6, RNA7, RNA8, RNA9, und RNA11) für die Spleißreaktion notwendig sind (Lustig et al., 1986). Für RNA11 konnte außerdem gezeigt werden, daß es ein essentieller Bestandteil des 40S Spleißkomplexes ist (Chang et al., 1988). Außerdem konnte belegt werden, daß sich in den Spleißkomplexen mehrere kleine kernkodierte RNA Moleküle, die bereits oben genannten snRNAs befinden. Ferner konnte für die snRNA20 (Ares, 1986) und die snRNA19 (Kretzner et al., 1987; Siliciano et al., 1987), die bei höheren Eukaryonten der U2

und U1 RNA entsprechen, ein direkter Basenkontakt mit konservierten Intronsequenzen in mRNA-Vorläufermolekülen bestätigt werden (Seraphin et al., 1988; Parker et al., 1987).

Neuere Spleißmodelle gehen davon aus, daß U1- und U2-snRNPs mit der Prä-mRNA in einem "Prä-Spleißkomplex" (20S) vorliegen, und daß dabei die U2-snRNA an die interne Erkennungsregion und die U1-snRNA an die 5' Erkennungsstelle binden. Im 40S Spleißkomplex, in dem man neben U2- auch U4-, U5- und U6-snRNAs nachweisen kann, wird dann das lassoförmige Intermediat gebildet, indem nach dem Schnitt am 5' Ende durch 2' - 5' Bindung ein lassoförmiges 2/3-Molekül (lassoförmiges Intron mit zweitem Exon) entsteht. In einem zweiten Schritt erfolgt schließlich der Schnitt am 3' Ende, wobei gleichzeitig beide Exons verknüpft werden (Cheng und Abelson, 1987).

Neben der detaillierten Analyse des Spleißkomplexes haben sich die Untersuchungen des mRNA Spleißvorganges auf die Primärstruktur der Vorläufer-mRNA konzentriert. Für das 5' Ende und das 3' Ende konnte jeweils eine Konsensus-Erkennungssequenz ermittelt werden, die sowohl für niedere, als auch für höhere Eukaryonten gültig ist. Nach dieser GT - AG Regel beginnt jedes mRNA Intron mit GU und endet mit AG (Mount, 1982).

5' Spleißstellen von *Saccharomyces cerevisiae* müssen jedoch zusätzliche Sequenzbedingungen erfüllen, um als Erkennungssignale für die Spleißreaktion zu dienen. Bis auf wenige Ausnahmen (GUACGU beim Gen des ribosomalen Proteins *RP51-2*; Pikielny et al., 1983) folgen alle 5' Spleißstellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* der Konsensussequenz GUAUGU. Zudem besitzt *Saccharomyces cerevisiae* eine streng konservierte interne Erkennungssequenz, die "UACUAAC-Box" oder auch "TACTAAC-Box" genannt wird (Langford und Gallwitz, 1983; Langford et al., 1984), die ebenfalls in allen mRNA Intronsequenzen zu finden ist. Während höhere Eukaryonten keine solche stark konservierte interne Erkennungssequenz aufweisen, besitzt die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* eine der "UACUAAC-Box" sehr ähnliche interne Erkennungssequenz (CUPuAPy). Sowohl bei *Saccharomyces cerevisiae* als auch bei *Schizosaccharomyces pombe* dient das letzte Adenosin der internen Erkennungssequenz jeweils als Verzweigungspunkt des lassoförmigen Spleißintermediates. Über die genannten Sequenzbedingungen der Introns am 5' Ende, 3' Ende und an der internen Erkennungsregion hinaus, gibt es bisher keine Hinweise auf weitere stark konservierte Sequenzmotive in den mRNA Introns von Hefe.

Die flankierenden Exonsequenzen scheinen im Gegensatz zu tRNA-Vorläufermolekülen keinen Einfluß auf die Spleißreaktion auszuüben (Duchêne et al., 1988), da das erste Exon des Actin-gens bis auf ein Nukleotid deletiert werden konnte, ohne den ersten Schritt der Spleißreaktion zu blockieren. Sogar ein Intron ohne ein erstes Exon wird als solches erkannt und bildet in vitro einen 40S Spleißkomplex (Duchêne et al., 1988). Auch die Sequenz des 3' Exons scheint keinen Einfluß auf den mRNA Spleißprozeß zu haben. Konstrukte die nur aus einem 5' flankierenden Exon mit angrenzendem Intron, jedoch ohne zweites Exon bestehen, werden ebenfalls als spleißbare Prä-mRNA Moleküle erkannt (Rymond und Rosbash, 1985).

Sofern mehrere Intronsequenzen oder zumindest mehrere 5' oder 3' Spleißsignale in einem mRNA-Vorläufermolekül vorhanden sind, können durch den Spleißprozeß theoretisch verschiedene reife mRNA Produkte entstehen. Besonders bei höheren Eukaryonten besitzen mRNA-Vorläufermoleküle häufig mehrere intervenierende Sequenzen und zusätzlich 5' und 3' Spleißsignale (GT und AG). In der Tat konnte bis heute in mehr als 50 Fällen nachgewiesen werden, daß alternative Spleißprodukte entstehen (Breitbart et al., 1987). In vielen Fällen konnten diesen alternativen Spleißprodukten auch wichtige biologische Funktionen zugeordnet werden. Dies bedeutet, daß diese Produkte nicht das Ergebnis zufälliger Vorgänge sind, sondern ganz gezielt zelltypspezifisch oder entwicklungsspezifisch produziert werden. Dadurch, daß von einem Gen mehr als ein definiertes Genprodukt entstehen kann, besitzen solche biologischen Systeme eine sehr viel größere Flexibilität und dadurch eventuell auch einen evolutionären Vorteil. Wie jedoch die Regulation solcher alternativen Spleißprozesse aussieht, ist unklar. Zwar gibt es erste experimentelle Ansätze, in denen durch Mutation der flankierenden Sequenzen von Spleißsignalen auch die Benutzung dieser Spleißsignale verändert werden konnte, doch müssen zusätzlich zu diesen in cis wirkenden Faktoren auch in trans wirkende Faktoren an der Regulation beteiligt sein. Nur so wären zell- oder gewebspezifische alternative Spleißprodukte von einem Gen zu erklären.

Funktion von Introns

Die Tatsache, daß viele eukaryontische Gene durch intervenierende Sequenzen unterbrochen sind, führte natürlich auch zu der Frage nach der möglichen Rolle und Funktion der Introns. Um diese Frage zu beantworten, liegt es nahe, auch nach dem Ursprung der Introns zu fragen. Bereits 1978 wurden dafür zwei prinzipiell verschiedene Hypothesen vorgeschlagen.

Eine der Hypothesen (Doolittle, 1978; Darnell, 1978) geht davon aus, daß sich Gene bereits als diskontinuierliche Strukturen entwickelt haben, daß also die Intronsequenzen von Beginn an vorhanden waren. Die andere Hypothese geht davon aus, daß die Diskontinuität der Gene erst im Laufe der Evolution durch die Insertion von Transposons entstanden ist (Cavalier-Smith, 1978; Crick, 1979; Cavalier-Smith, 1985).

Beide Hypothesen setzen voraus, daß gleichzeitig mit der Entstehung der Introns auch Spleißmechanismen sich hätten entwickeln müssen, bzw. schon hätten vorhanden sein müssen. Das zweite Modell, das den Ursprung der Introns in der Integration von Transposons im Laufe der Evolution sieht, hat jedoch folgenden Nachteil: Das neu inserierte Transposon muß die für die Spleißreaktion notwendigen Sequenzmotive an den Intronenden tragen. Bis heute sind jedoch keine Transposons bekannt, die Spleißsignale an den 5' und 3' Enden tragen. Es gibt zwar ein Beispiel einer "späten" Intronintegration im mitochondrialen Genom von Hefe (21S rRNA), bei der durch Genkonversion mit der im Intron selbst kodierten Transposase die Integration

ermöglicht wird (Jaquier und Dijon, 1985; Macreadie et al., 1985), doch dürfte dies eher einen Spezialfall darstellen.

Die Vorstellung, daß diskontinuierliche Strukturen ursprünglich vorhanden waren, wird dadurch unterstützt, daß es immer mehr Anzeichen dafür gibt, daß sich die verschiedenen Spleißmechanismen von einer durch die RNA autokatalysierten Reaktion ableiten (Sharp, 1985). Dieser "self-splicing"-Mechanismus ist thermodynamisch stark begünstigt, und erlaubt dadurch auch die Umkehr der Reaktion, nämlich die Reintegration der herausgeschnittenen Sequenz. Da die herausgeschnittene intervenierende Sequenz alle für die Spleißreaktion notwendigen Voraussetzungen selbst besitzt, ist es auch nach Reintegration in homologe oder nicht-homologe Regionen möglich, diese Introns wieder zu entfernen (Kruger et al., 1982).

Welche generelle Funktion Introns früher besessen haben, oder heute noch haben, lassen diese Modelle jedoch nicht erkennen. Auch die "exon-shuffling"-Hypothese (Gilbert, 1978), wonach Introns dazu beitragen verschiedene Exonsequenzen mit verschiedenen funktionellen Proteindomänen zusammenzubringen, trifft nur in einigen Fällen zu (Südhof, 1985a; Patel et al., 1987). Somit bleibt die Frage nach einer generellen Funktion von Introns unbeantwortet, und es muß am Einzelfall untersucht werden, ob und welche Funktion eine intervenierende Sequenz besitzt.

Während beispielsweise Vertebraten oder Pflanzen viele Gene mit Introns besitzen, gibt es davon in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nur relativ wenige. Fink hat 1987 ein Modell vorgeschlagen, das dieses Phänomen erklären könnte. Danach besteht das Hefegenom fast ausschließlich aus aktiven Pseudogenen. Die hohe homologe Rekombinationswahrscheinlichkeit bei der Hefe soll dafür sorgen, daß gespleißte mRNA Moleküle, die durch reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben worden sind, durch homologe Rekombination die intronhaltigen Gene ersetzen. Dieses Modell würde außerdem erklären, warum die wenigen bekannten Introns in Hefe fast ausschließlich in der Nähe des 5' Endes zu finden sind, da sie dort von der reversen Transkription und der homologen Rekombination nicht so effizient erfaßt werden. Nur das *MATa1* Gen macht hiervon eine Ausnahme, denn es besitzt wie oben bereits erwähnt am 3' Ende des Gens ein zweites Intron. Neben der hohen homologen Rekombinationshäufigkeit könnte jedoch auch die zusätzliche Kopie des *MATa1* Gens an einem der stummen Genloci (*HMR* oder *HML*) zum Erhalt dieser Introns beitragen.

Es gibt viele Beispiele dafür, daß Intronsequenzen wichtige biologische Funktionen besitzen können. Bereits erwähnt wurde das Intron der 21S rRNA aus dem mitochondrialen Genom der Hefe, dessen Intron für eine Transposase kodiert, die für die Integration des Introns verantwortlich ist (Macreadie et al., 1985). Ein weiteres Beispiel bei der Hefe ist das Intron der *SUP6* tRNA^{Tyr}, wo nachgewiesen werden konnte, daß die intervenierende Sequenz für die bei der Reifung der tRNA auftretenden Modifikationen wichtig ist (Johnson und Abelson, 1983). Die gewebsspezifische Transkription von P-Elementen bei *Drosophila melanogaster* ist sowohl ein Beispiel für "Intronfunktion", als auch für alternatives Spleißen (Laski et al., 1986). Nur in Keimbahnzellen wird das dritte Intron des P-Elements entfernt, wodurch eine aktive Transposase

entsteht, die die Transposition in Keimbahnzellen ermöglicht. In somatischen Zellen werden nur die beiden ersten Introns entfernt. Daß dies keinen Einzelfall darstellt, belegen viele weitere alternative Spleißprodukte, deren biologische Funktionen zum großen Teil bereits in vivo belegt werden konnten (Breitbart et al., 1987). Auch bei Vertebraten wurden Intronsequenzen mit wichtigen biologischen Funktionen gefunden. So wurde im Intron der schweren Immunglobulinkette ein Transkriptionsaktivator ("enhancer") lokalisiert, der für die gewebsspezifische Expression dieses Gens verantwortlich ist (Gillies et al., 1983).

Neben den genannten Intronfunktionen gibt es eine Reihe weiterer Beispiele, die jedoch zum großen Teil genspezifischer Natur sind, das heißt nicht eine allgemeine Funktion der Introns reflektieren.

PROBLEMSTELLUNG

Durch gezielte Mutationen war früher gezeigt worden, daß die konservierten Nukleotide in den intervenierenden Sequenzen der Hefe (5' Spleißstelle, interner Verzweigungspunkt, 3' Spleißstelle) für die Spleißreaktion unabdingbar sind (Langford et al., 1984; Newman et al., 1985; Parker und Guthrie, 1985; Fouser und Friesen, 1986; Vijayraghavan et al., 1986). Außerdem war gezeigt worden, daß zumindest Teile der nicht-konservierten Intronsequenzen für korrektes Spleißen nicht notwendig sind (Pikielny und Rosbash, 1985; Fouser und Friesen, 1987).

Ausgehend von der 54 Nukleotide langen Intronsequenz des *MATa1* Gens von *Saccharomyces cerevisiae* sollte überprüft werden, ob es eine notwendige Minimallänge dieses Introns gibt, damit es noch korrekt aus einer Prä-mRNA herausgeschnitten werden kann. Außerdem sollte untersucht werden, ob dabei die Distanzen zwischen den konservierten Intronsequenzen (5' Spleißstelle, interner Verzweigungspunkt, 3' Spleißstelle) eine Rolle spielen, oder ob allein die Gesamtlänge des Introns über die Spleißbarkeit eines mRNA-Vorläufermoleküls entscheidet. Weiterhin sollte am Beispiel des *MATa1* Gens überprüft werden, ob es bei der Hefe, so wie es auch für viele Gene höherer Eukaryonten gezeigt wurde, alternatives Spleißen gibt.

Die ungewöhnliche Struktur des *MATa1* Gens mit den zwei intervenierenden Sequenzen, die zum Teil auch Homologien zu homeotischen Genen von *Drosophila* und *Xenopus* aufweisen, führte darüber hinaus zu der Fragestellung, ob eine oder beide der zwei Intronsequenzen eine biologische Funktion besitzen. Durch exakte Deletion der intervenierenden Sequenzen am chromosomalen *MATa* Locus sollten deshalb entsprechende Hefemutanten erzeugt und auf ihren Phänotyp hin untersucht werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Korrektes Spleißen und Spleißkomplexbildung der *MATa1* Vorläufer-mRNA in vitro erfordern eine Mindestdistanz zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt

3.1.1 Klonierung des *MATa1* Gens in pUC13 und M13mp19

Um detaillierte in vitro Untersuchungen am *MATa1* Gen durchführen zu können, wurde die gesamte Transkriptionseinheit, inklusive Promoterregion, kodierendem Bereich und Terminatorregion, in geeignete Plasmidvektoren subkloniert. Dies gestattete es dann, gezielt Veränderungen an der Primärstruktur des Gens durchzuführen. Freundlicherweise wurde uns von A. Newman (MRC, Cambridge) ein 4.2 Kbp großes genomisches HindIII Fragment aus *Saccharomyces cerevisiae* zur Verfügung gestellt, welches den gesamten *MATa* Locus mit flankierenden DNA Sequenzen (Astell et al., 1981) enthält.

Dieses 4.2 Kbp HindIII Fragment wurde zunächst in einen mit HindIII linearisierten pUC13 Vektor ligiert und damit transformationskompetente *E. coli* JM109 Zellen transformiert. Die Selektion auf rekombinante Klone erfolgte nach IPTG-Induktion auf LB-Ampicillin-Platten, in Anwesenheit von X-Gal. Von mehreren weißen Kolonien wurden Flüssigkulturen angesetzt, daraus Plasmid-DNA nach der "Boiling"-Methode isoliert und durch analytische HindIII Spaltungen auf Insertion des HindIII Fragments in den pUC13 Vektor untersucht. Der Klon, der das HindIII Fragment enthielt, wurde mit pMAT/WT bezeichnet und durch weitere Restriktionsspaltungen näher charakterisiert. In Abb. 3A sind diese Restriktionsanalysen und in Abb. 3B eine Restriktionskarte des subklonierten HindIII Fragmentes gezeigt. Die Orientierung des HindIII Fragments im pUC13 Vektor konnte durch den Restriktionsverdau mit EcoRI bestimmt werden. Aufgrund des Auftretens eines ca. 500 bp und eines ca. 6 Kbp großen EcoRI Restriktionsfragments ergab sich die in Abb. 3B angegebene Orientierung.

Aus diesem pMAT/WT Klon wurde anschließend ein 1090 bp langes XbaI-HindII Fragment isoliert (siehe Abb. 3B), welches das gesamte *MATa1* Gen enthält. Dieses Fragment wurde mit einem mit XbaI und SmaI geschnittenen M13mp19 Vektor verknüpft und transformationskompetente *E. coli* JM109 Zellen damit transformiert. Nach IPTG Induktion wurde in Anwesenheit von X-Gal auf das Auftreten von weißen Plaques in einem konfluenten Bakterienrasen (JM109) hin untersucht. Aus mehreren weißen Plaques wurden rekombinante M13 Phagen isoliert, aus infizierten Bakterien und aus Phagen jeweils doppel- bzw. einzelsträngige DNA isoliert und die dsDNA durch analytischen Restriktionsverdau mit EcoRI und HindIII analysiert. Klone mit einer ca. 1.1 Kbp großen Insertion wurden durch weitere Restriktionsspaltungen näher charakterisiert und die Orientierung der Insertion

bestätigt (Abb. 4A). Abb. 4B zeigt eine Restriktionskarte des erhaltenen *MATa1* Subklons pMAT13/WT.

A



B

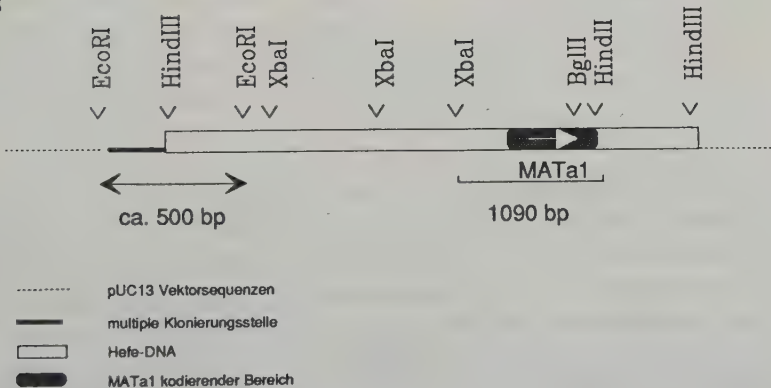


Abb. 3: Restriktionsanalyse des Klon pMAT/WT (A) und Restriktionskarte des 4.2 Kbp HindIII *MATa1* Fragments (B)

A: Analytische Restriktionsspaltungen des Klon pMAT/WT. Jeweils 1 µg Plasmid-DNA wurde mit den unten angegebenen Enzymen gespalten und neben dem λIII Längenstandard auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: λIII-Längenstandard

Spur 4: pMAT/WT x EcoRI

Spur 2: pUC13 x HindIII

Spur 5: pMAT/WT x XbaI

Spur 3: pMAT/WT x HindIII

Spur 6: pMAT/WT x BglII

B: Schematische Darstellung des genomischen 4.2 Kbp *MATa1* Fragment mit einigen wichtigen Restriktionsschnittstellen sowie der Position und Orientierung des *MATa1* Gens.

3.1.2 Verschiedene in vitro Mutagenesen des *MATa1* Gens

Die folgenden Mutageneseexperimente wurden im M13 System durchgeführt, wobei keinerlei Selektion auf den mutagenisierten Strang ausgeübt wurde. An einzelsträngige Matrizen-DNA, die aus pMAT13/WT Phagen isoliert worden war, hybridisierte man die dazu komplementären phosphorylierten Mutagenese-Oligodeoxynukleotide und synthetisierte mit der Klenow-Polymerase den gesamten komplementären Strang beginnend am 3' Ende des Oligodeoxynukleotids. Nach erfolgter Ligation und Transformation in *E. coli* JM109 Zellen wurden JM109 Rasenzellen damit infiziert und inkubiert. Durch Plaquehybridisierungen mit den 5'-[32P]-markierten Mutagenese-Oligodeoxynukleotiden wurden positiv hybridisierende Plaques isoliert und durch Sequenzanalyse einzelsträngiger Phagen-DNA die eingeführten Mutationen bestätigt (siehe Abb. 5). Die Ausbeuten der Mutagenesen lagen bei etwa 5 %.

Insertion einer SmaI-Restriktionsschnittstelle in das erste Intron (Konstruktion von pMAT13/S)

Im ersten Intron des *MATa1*Gens wurde eine singuläre SmaI-Restriktionsschnittstelle erzeugt, um später, ausgehend von dieser Schnittstelle, verschiedene Deletionen erzeugen zu können (vgl. Kapitel 3.1.4.1). Für die Mutagenese wurde das Oligodeoxynukleotid MS (5'-GTAAATTGATTCccgGGCTATCCTTG-3') verwendet, wodurch drei aufeinanderfolgende Thymidinreste durch ein Cytosin und zwei Guanosinreste ersetzt wurden (CCTTTGA → CCcggGA).

Exakte Deletion des ersten Introns (Konstruktion von pMAT13/ Δ IVS1)

Die exakte Deletion des ersten Introns im *MATa1* Gen wurde mit Hilfe des Mutagenese-Oligodeoxynukleotids E1-2 (5'-CTTTCCATTATAAAA-ATTATAAAGA-3), das komplementär zum Ende des ersten und Beginn des zweiten Exons des *MATa1* Gens ist, erzeugt. Das aus dieser Mutagenese resultierende *MATa1* Konstrukt, dem das erste Intron fehlt, wurde später unter anderem als "Negativ-Kontrolle" bei verschiedenen in vitro Spleißuntersuchungen verwendet.

Insertion einer BamHI-Restriktionsschnittstelle am Transkriptionsstart (Konstruktion von pBMAT13/WT)

Nasmyth et al. (1981) haben für das *MATa1* Gen zwei Transkriptionsstartstellen, und zwar an den Positionen -11 bis -9 und -2 bis +1 (siehe Abb. 6) durch S1-Analysen näherungsweise bestimmen können. Unmittelbar vor der Transkriptionsstartstelle bei -11 sollte durch gezielte in vitro Mutagenese eine BamHI-Restriktionsschnittstelle eingeführt werden, um später durch eine BamHI/EcoRI Restriktionsspaltung den gesamten transkribierten Bereich des *MATa1*

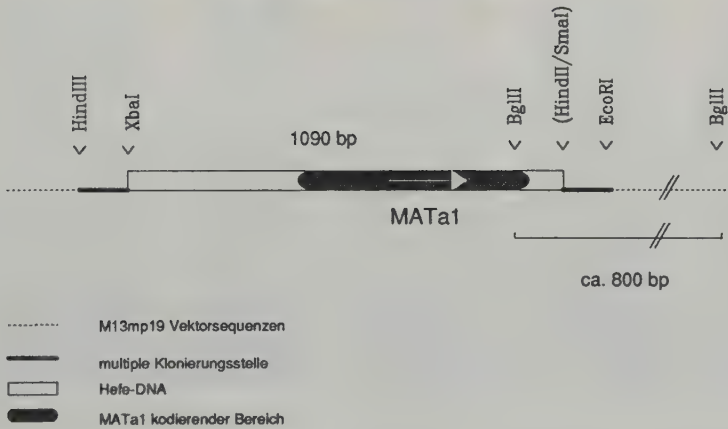
A**B**

Abb. 4: Restriktionsanalyse des Klon *pMAT13/WT* (A) und schematische Darstellung des 1090 bp großen *MATA1* Fragments (B)

A: Restriktionsspaltungen des Klon *pMAT13/WT*, aus denen auch die Orientierung der Insertion hervorgeht. Jeweils 1 µg doppelsträngige Phagen-DNA wurde mit den unten angegebenen Enzymen gespalten und auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: λ III-Längenstandard

Spur 4: M13mp19 x BglII

Spur 2: M13mp19 x EcoRI/HindIII

Spur 5: *pMAT13/WT* x BglII

Spur 3: *pMAT13/WT* x EcoRI/HindIII

B: Schematische Darstellung des subklonierten *MATA1* Gens in M13mp19.

Gens in Transkriptionsvektoren subklonieren zu können. Diese BamHI-Restriktions-schnittstelle wurde sowohl im Wildtyp-Konstrukt (*pMAT13/WT*), als auch in den beiden

Mutanten pMAT13/S und pMAT13/ Δ IVS1 erzeugt. Die in vitro Mutagenese Experimente wurden wie oben beschrieben durchgeführt, und als Primer wurde das Oligodeoxynukleotid MB (5'-GTTGTCCTTCTGgATccTCTTTGATATA-3') verwendet. Dieses Mutagenese-Oligodeoxynukleotid erzeugt in der DNA Sequenz vor der Transkriptionsstartstelle eine BamHI-Restriktionsschnittstelle indem drei Bausteine der DNA verändert werden (AAATCAA $\rightarrow$ AggATCcA). Durch Plaquehybridisierungen wurden positiv hybridisierende M13 Phagen selektioniert, daraus doppelsträngige DNA isoliert und durch Restriktionsspaltungen mit BamHI charakterisiert. Die nach dieser Mutagenese erhaltenen Klone wurden mit pBMAT13/WT, pBMAT13/S und pBMAT13/ Δ IVS1 bezeichnet.

3.1.3 Subklonierung der mutagenisierten *MATa1* DNAs in pSP64 Vektoren

Anschließend an die in vitro Mutagenese des *MATa1* Gens wurden die in vivo transkribierten Bereiche der *MATa1* Konstrukte pBMAT13/WT, pBMAT13/S und pBMAT13/ Δ IVS1 als BamHI-EcoRI Fragmente in pSP64 Vektoren subkloniert, um damit später sowohl radioaktiv markierte als auch nicht-radioaktiv markierte mRNA-Vorläufermoleküle zu synthetisieren.

Für die entsprechenden Klonierungen wurden von den oben genannten *MATa1* Konstrukten aus der replikativen Form der rekombinanten Phagen-DNA die gewünschten, ca. 630 bp großen BamHI-EcoRI Fragmente aus "Low Melting Point"-Agarosegelen isoliert. Der mit BamHI und EcoRI geschnittene Vektor pSP64 wurde auf die gleiche Weise isoliert. Nach erfolgter Ligation und anschließender Transformation in *E. coli* JM109 Zellen wurden die ampicillinrestitenten Klone durch Plasmidminipräparationen und analytische Restriktionsspaltungen der Plasmid-DNA mit BamHI und EcoRI untersucht. Die auf diese Weise erhaltenen *MATa1* Subklone wurden mit pBEMAT/WT (Wildtyp *MATa1* Sequenz), pBEMAT/S (SmaI-Restriktionsschnittstelle im ersten Intron) und pBEMAT/ Δ IVS1 (Deletion des ersten Introns) bezeichnet.

Aufgrund des im pSP64 Vektor enthaltenen SP6 Phagenpromotors konnte nun in vitro von den verschiedenen *MATa1* Konstrukten RNA synthetisiert werden.

3.1.4 Spleißanalysen von *MATa1* Transkripten mit verkürztem ersten Intron

Eine der Fragestellungen dieser Arbeit war, inwieweit die Intronlänge, bzw. die Abstände zwischen den konservierten Sequenzen im Intron bei der Spleißreaktion eine Rolle spielen.

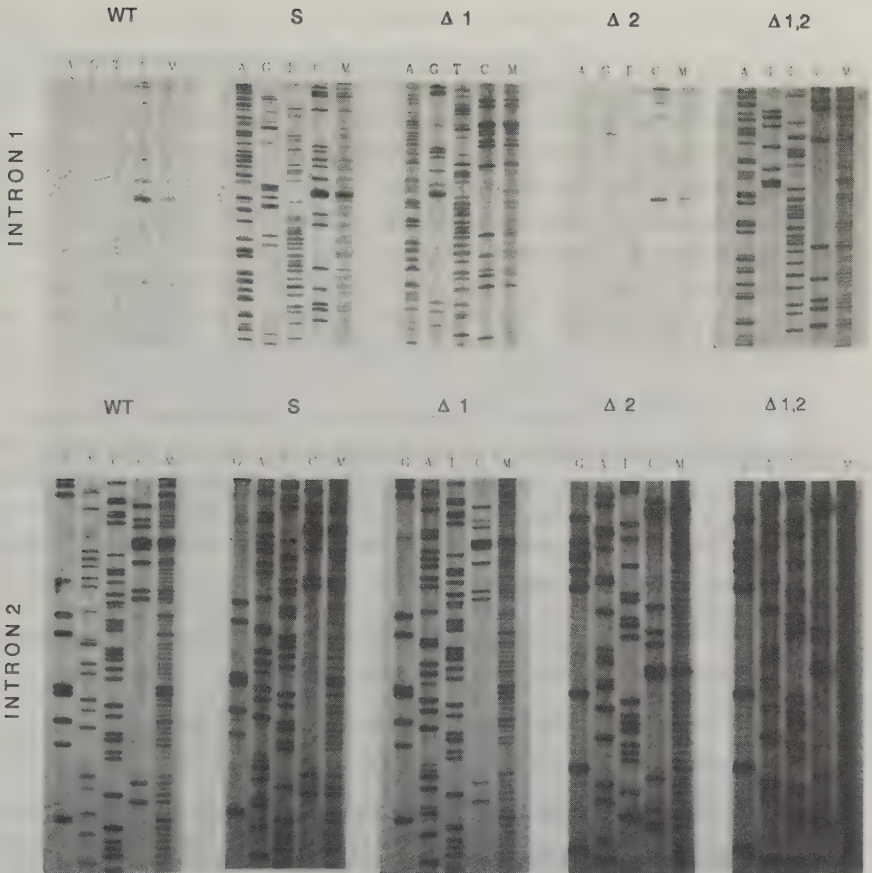


Abb. 5: DNA-Sequenzanalyse der mutagenisierten Regionen im *MATa1* Gen

Die Plasmidkonstrukte pBEMAT/WT (WT), pBEMAT/S (S), pBEMAT/ Δ IVS1 (Δ 1), pBEMAT/ Δ IVS2 (Δ 2) und pBEMAT/ Δ IVS1,2 (Δ 1,2) wurden durch Plasmidsequenzierung mit Klenow-Polymerase charakterisiert. Die Sequenzanalysen in der Region des ersten Introns wurden mit dem pSP64 Sequenzierprimer, die Analysen in der Region des zweiten Introns mit dem MAT Sequenzierprimer 2 durchgeführt.

Aus diesem Grund wurden im ersten Intron des *MATa1* Gens folgende Mutationen eingeführt:

1) Es wurden unterschiedlich lange Deletionen zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt erzeugt.

2) Es wurden längenkompensatorische Mutationen in der Form generiert, daß die zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt deletierten Sequenzen, zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle wieder inseriert wurden, so daß die ursprüngliche Gesamtlänge des Introns wieder hergestellt war.

3) Es wurden die Deletionen, die zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt erzeugt worden waren, durch die Insertion einer beliebigen Nukleotidsequenz so kompensiert, daß die ursprüngliche Distanz zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt wiederhergestellt war.

			→	→	
1501	CTCCTTATAT	CAAAGAAAAT	CAAGAAGGAC	AACATGGATG	ATATTTGTAG
1551	TATGGCGGAA	AACATAAACA	GAACTCTGTT	TAACATTCTA	GGTACTGAGA
1601	TTGATGAAAT	CAATCTCAAT	ACTAATAATC	TTTATAATGT	ATGTTTTTCAT
1651	TTCAAGGATA	GCCTTTGAAT	CAATTT <u>TACTA</u>	<u>ACA</u> ACTTTC	AGTTTATAAT
1701	GGAAAGTAAT	TTGACTAAAG	TAGAGCAACA	TACATTACAC	AAAAATATTT
1751	CTAACAATAG	GTTAGAAATA	TACCACCACA	TTAAAAAAGA	GAAGAGCCCA
1801	AAGGGAAAAT	CATCAATATC	ACCCCAAGCA	CGGGCATTTT	TAGAACAGGT
1851	TTTTAGAAGA	AAGCAAAGCC	TTAATTCCAA	GGAAAAAGAA	GAAGTTGCAA
1901	AGAAATGTGG	CATTACTCCA	CTTCAAGTAA	GAGTTTGGGT	ATGTAATATG
1951	AGAATCAAAC	TTAAATATAT	CCTATA <u>TACTAA</u>	CAATTTGTAG	TTCATAAATA
2001	AACGTATGAG	ATCTAAATAA	ATTCGTTTTT	AATGATTAAA	ATAGCATAGT
2051	CGGGTTTTTC	TTTGTAGTTT	AGCTTTCCGC	AACAGTAAAA	TTTTATAAAC
2101	CCTGGTTTTG	GTTTTGTAGA	GTGGTTGACG	AATAATTATG	CTGAAGTACG

Abb. 6: DNA Sequenz des *MATa1* Gens und eines Teils der flankierenden Regionen

Die abgedruckte DNA Sequenz des *MATa1* Gens ist der Nukleinsäuredatenbank "Genbank" (UPDATE 01/07/85, YSCMATA) entnommen. Translatierte Exonsequenzen sind fett und Intronsequenzen sind kursiv gedruckt. Die "TACTAAC-box" in den beiden Introns ist jeweils unterstrichen und die möglichen Transkriptionsstartstellen sind durch Pfeile über der entsprechenden Sequenz angegeben.

3.1.4.1 Erzeugung von Deletionen zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt

Für die Größe der Deletionen, die zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt erzeugt werden sollten, gab es keine genauen Vorgaben. Es war deshalb unnötig, durch

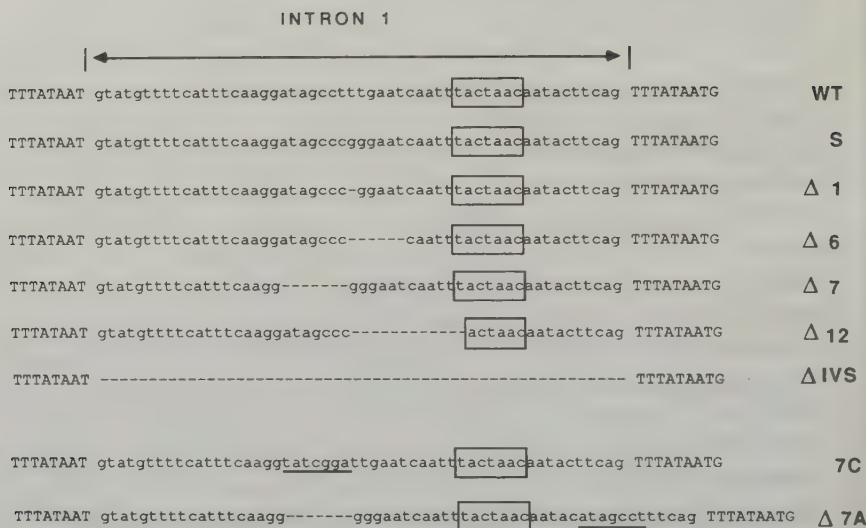
gezielte in vitro Mutagenese bestimmte Mutationen definierter Länge zu erzeugen. Die einzige Bedingung, die an die Deletionen gestellt wurde, war, daß sie relativ kurz sein sollten und keine konservierten Regionen der intervenierenden Sequenz betreffen sollten. Aus diesem Grund wurde eine einfache Methode angewandt, die durch kombinierte T4 DNA Polymerase / Mung Bean Nuklease / Klenow Polymerase Behandlung, ausgehend von einem linearen doppelsträngigen DNA Molekül, von beiden Enden her kurze Deletionen erzeugt. Ausgangspunkt hierfür war das Plasmid pBEMAT/S, das eine singuläre SmaI-Restriktionsschnittstelle im ersten Intron des *MATa1* Gens zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt besitzt. 2 µg dieses Plasmids wurden mit SmaI komplett gespalten und wie oben beschrieben behandelt. Nach Ligation und anschließender Transformation in kompetente *E. coli* JM109 Zellen wurde durch Plasmidminipräparationen doppelsträngige Plasmid-DNA aus den rekombinanten Klonen isoliert. Durch Sequenzierung der Plasmid-DNA mit dem pSP64 Sequenzierprimer wurden schließlich die Plasmide näher charakterisiert. Nur etwa 10 % der erhaltenen Klone entsprachen dem Ausgangsprodukt pBEMAT/S. Die restlichen Klone hatten die SmaI-Restriktionsschnittstelle verloren und besaßen verschieden lange und in beide Richtungen verlaufende Deletionen. Abb. 7A zeigt jeweils einen Ausschnitt aus der *MATa1* Sequenz mit den durch die Sequenzierung bestimmten Deletionen. In Abb. 7B sind die entsprechenden Autoradiogramme der Deletionsmutanten pBEMAT- Δ 1, pBEMAT- Δ 6, pBEMAT- Δ 7 und pBEMAT- Δ 12 zu sehen, die Deletionen von 1, 6, 7 oder 12 Nukleotiden Länge aufweisen.

3.1.4.2 Untersuchungen zur Bildung von Spleißkomplexen

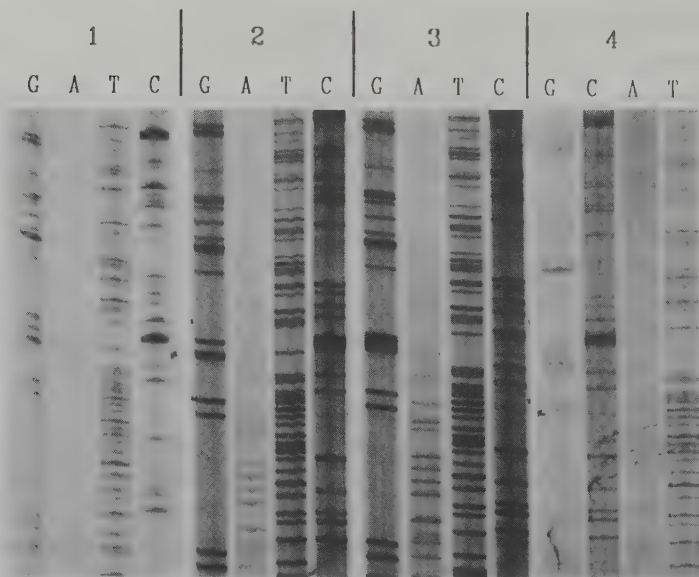
Vorläufer-mRNAs der Intron-Deletionsmutanten pBEMAT- Δ 1 (Δ 1), pBEMAT- Δ 6 (Δ 6), pBEMAT- Δ 7 (Δ 7) und pBEMAT- Δ 12 (Δ 12), sowie der "Sma-Mutante" pBEMAT/S (S) und des "Wildtypkonstrukts" pBEMAT/WT (WT) (siehe Abb. 7) sollten im folgenden daraufhin untersucht werden, ob die Vorläufer-mRNAs aus den Deletionsmutanten noch geeignete Substrate für die in vitro Spleißreaktion darstellten. Dies geschah zunächst durch den positiven oder negativen Nachweis in vitro gebildeter Spleißkomplexe mittels Zentrifugation solcher Komplexe durch Glyceringradienten.

Dazu wurden zunächst je 10 µg Plasmid-DNA der verschiedenen Deletionsmutanten Δ 1, Δ 6, Δ 7 und Δ 12 sowie der S-Mutante und des Wildtyp-Konstrukts vollständig mit MboII-gespalten. Es entstand dabei neben anderen Fragmenten ein etwa 700 bp großes Restriktionsfragment, das die SP6 Promotorregion, das komplette erste Exon und Intron, sowie einen Teil des zweiten Exons des *MATa1* Gens enthielt (siehe dazu auch Abb. 12). Die Restriktionsansätze wurden mit Chloropane und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und zu einer DNA-Konzentration von 0.5 mg/ml in Wasser gelöst.

A



B



Je 2 µl dieser DNA-Lösungen ($\approx 1 \mu\text{g}$ DNA) wurden für in vitro Transkriptionen mit SP6 Polymerase verwendet und radioaktiv markierte Vorläufer-mRNA Moleküle der verschiedenen Konstrukte synthetisiert. Die Bedingungen der in vitro Transkription, der Elektrophorese, sowie der anschließenden Elution aus dem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgel ist in Kapitel 6.26 beschrieben. Aufgrund der Einbaurate von radioaktiv markierten UTP Molekülen konnte die Menge an in vitro synthetisierter RNA berechnet werden. In der Regel wurden etwa 2 pMole Vorläufer-mRNA ausgehend von 1 µg Matrizen-DNA synthetisiert. Die spezifische Aktivität der Transkripte betrug ca. $5 \cdot 10^5$ cpm/pMol.

Von den zu untersuchenden RNA Transkripten (WT, S, $\Delta 1$, $\Delta 6$, $\Delta 7$, $\Delta 12$) wurden parallel in vitro Spleißansätze mit und ohne Zusatz von ATP durchgeführt, um ATP-abhängige von ATP-unabhängigen Effekten unterscheiden zu können. Für die in vitro Spleißansätze wurden jeweils 200 fMole Vorläufer-mRNA und ein aus dem Hefestamm EJ101 gewonnener Spleißextrakt verwendet. Die in vitro Spleißansätze wurden inkubiert, auf 15 - 40 %igen Glyceringradienten aufgetrennt, fraktioniert und die Cerenkov-Strahlung im Szintillationszähler gemessen.

Abb. 8 zeigt die graphische Darstellung der Radioaktivitätsverteilung über die Gradienten. Verwendete man für die in vitro Spleißreaktionen Vorläufer-mRNA der Wildtypsequenz (WT), so ergab sich die in Abb. 8A gezeigte Verteilung der Radioaktivität. Nur in Anwesenheit von ATP während der in vitro Spleißreaktion konnte ein mit etwa 40S sedimentierender Komplex (Fraktionen 5 - 8) nachgewiesen werden. Ein weiterer Komplex (Fraktionen 17 - 20) wird ATP-unabhängig gebildet und tauchte auch bei Kontrollexperimenten mit RNA Transkripten ohne Intronsequenzen auf (nicht gezeigt). Verwendete man für die in vitro Spleißansätze mRNA-Vorläufermoleküle der "Sma-Mutante" oder der Deletionsmutanten $\Delta 1$, $\Delta 6$ oder $\Delta 7$, so ergaben sich sehr ähnliche Radioaktivitätsverteilungen wie für das "Wildtyp-Konstrukt" (Abb. 8B, 8C, 8D, 8E).

Kein eindeutiges Ergebnis wurde mit der $\Delta 12$ -Mutante, deren intervenierende Sequenz um 12 Nukleotide verkürzt war, erhalten (Abb. 8F), d. h. es konnte nicht eindeutig entschieden werden, ob ein ATP-abhängiger 40S Komplex gebildet wurde oder nicht. Die $\Delta 12$ -Deletion reicht bereits in die konservierte interne Erkennungsregion ("TACTAAC-Box") hinein, und es ist somit zu vermuten, daß solche mRNA-Vorläufermoleküle kein geeignetes

Abb. 7: DNA-Sequenzen aller in dieser Arbeit erzeugten *MATa1* Intron 1 Mutanten

A: Intronsequenzen sind in Kleinbuchstaben und flankierende Exonsequenzen in Großbuchstaben dargestellt. Die konservierte "TACTAAC-Box" ist umrandet und kurze Striche deuten deletierte Nukleotide an. Unterstrichene Sequenzen markieren Insertionen. WT = Wildtypsequenz, S = Sequenz der Sma-Mutante, $\Delta 1$ = Deletion von einem Nukleotid, $\Delta 6$ = Deletion von 6 Nukleotiden, $\Delta 7$ = Deletion von 7 Nukleotiden, $\Delta 12$ = Deletion des gesamten ersten Introns, 7C = Austausch von 7 Nukleotiden vor der "TACTAAC-box", $\Delta 7A$ = Insertion von 7 Nukleotiden in $\Delta 7$ nach der "TACTAAC-Box". B: Autoradiographien der DNA-Sequenzen der Deletionsmutanten pBEMAT-SA1 (1), pBEMAT-SA6 (2), pBEMAT-SA7 (3) und pBEMAT-SA12 (4). Als Primer für die DNA-Sequenzierung mit Klenow Polymerase wurde der pSP64 Sequenzierprimer benutzt.

Substrat für die Spleißreaktion sind. Für die übrigen Deletionsmutanten konnte jedoch gezeigt werden, daß trotz der verschieden langen Deletionen zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt diese mRNA-Vorläufermoleküle als zu prozessierende Strukturen *in vitro* erkannt werden.

3.1.4.3 Nachweis verschiedener Spleißprodukte

Durch Glyceringradientenanalysen konnte also gezeigt werden, daß alle Deletionsmutanten außer der $\Delta 12$ -Mutante, geeignete Substrate für die mRNA Spleißreaktion darstellen. Ob diese mRNAs auch tatsächlich *in vitro* prozessiert werden, sollte durch eine Analyse der Spleißprodukte geprüft werden.

Dazu wurden je 1 μg MboII-verdaute DNA der Plasmide pBEMAT/WT, pBEMAT/S, pBEMAT-S $\Delta 1$, pBEMAT-S $\Delta 6$, pBEMAT-S $\Delta 7$ und pBEMAT-S $\Delta 12$ *in vitro* transkribiert und damit nicht-radioaktiv markierte Vorläufer-mRNAs der verschiedenen Konstrukte synthetisiert. Für die *in vitro* Spleißreaktionen wurden je 200 fMole Vorläufer-mRNA und ein Hefespleißextrakt aus EJ101 Zellen, einem MAT α Hefestamm, verwendet. Es wurde ein MAT α Stamm gewählt, um zu gewährleisten, daß nicht durch endogene MAT $\alpha 1$ RNA die *in vitro* Ergebnisse verfälscht werden.

Die *in vitro* Spleißreaktionen wurden wie in Kapitel 6.28 beschrieben durchgeführt. Vom Kontrollansatz, welcher Vorläufer-mRNA der Wildtypsequenz (WT) enthielt, wurde jedoch unmittelbar nach dem Start der Reaktion die Hälfte entnommen und die Reaktion gestoppt. Die andere Hälfte wurde wie die übrigen Ansätze behandelt. Die extrahierten und mit Ethanol präzipitierten Ribonukleinsäuren der verschiedenen Ansätze wurden dann durch reverse Transkription analysiert. Zur Initiation der reversen Transkription wurde das 5'-[^{32}P]-markierte Oligodeoxynukleotid E2 (spez. Aktivität = $6 \cdot 10^6$ cpm/pMol), das spezifisch an die MAT $\alpha 1$ mRNA am Anfang des zweiten Exons hybridisieren kann, verwendet (siehe Abb. 9). Als spezifisches Kettenabbruchsnukleotid wurde bei diesen Analysen Dideoxy-guanosintriphosphat (ddGTP) verwendet. Wie aus Abb. 9 zu erkennen ist, sollte die reverse Transkription entlang einer unprozessierten Vorläufer-mRNA cDNA Transkripte von 31 Nukleotide Länge erzeugen. Falls es erst am zweiten Cytosin zu einem Kettenabbruch kommt, sollte ein 34 Nukleotide langes reverses Transkript entstehen. Ein cDNA Transkript von 37 Nukleotiden Länge wurde von der reversen Transkription prozessierter mRNA erwartet, da sich erst an Position 37 (bezogen auf das 5' Ende des Oligodeoxynukleotides) ein Cytosin in der RNA Matrize befindet.

In Abb. 10A ist das Autoradiogramm der reversen Transkriptionsanalyse der oben genannten MAT $\alpha 1$ Konstrukte gezeigt. Bei der Wildtypkontrolle (WT) waren zu Beginn der *in vitro* Spleißreaktion (0 Min) große Mengen an Vorläufer-mRNA vorhanden, wie die sehr starken

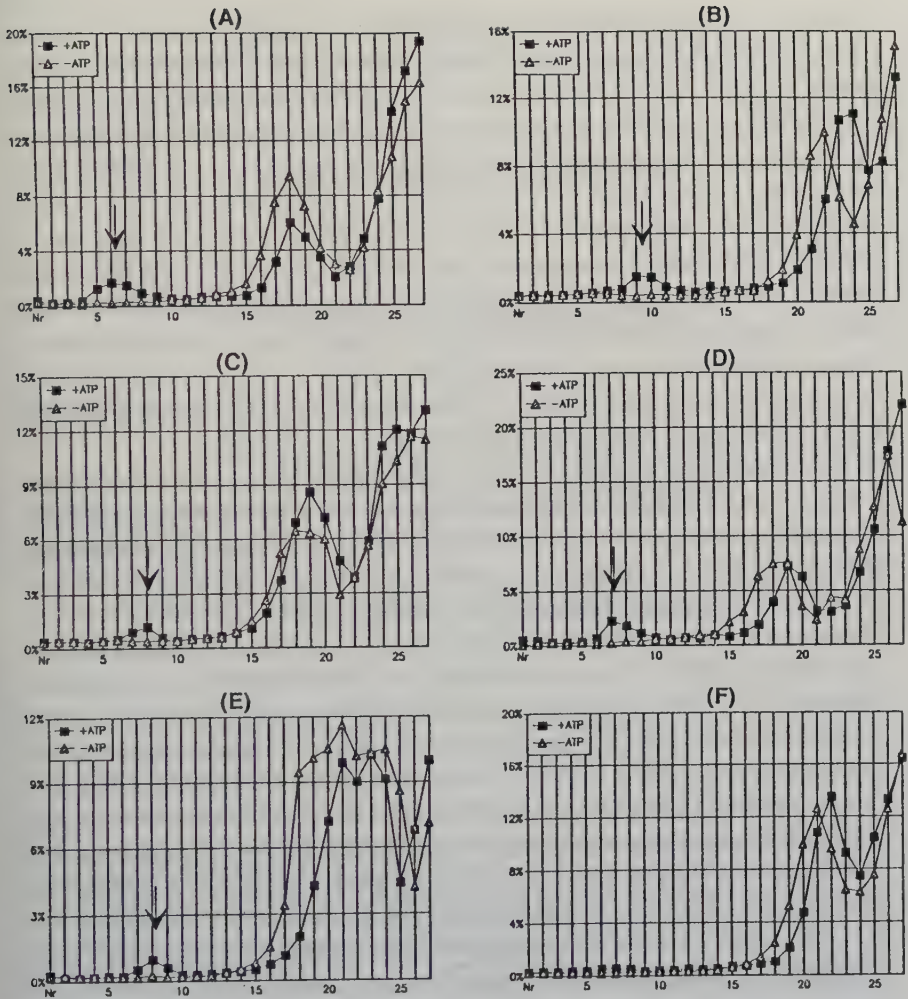


Abb. 8: Untersuchungen zur Ausbildung von mRNA Spleißkomplexen mittels Zentrifugation durch Glyceringradienten

Radioaktiv markierte Vorläufer-mRNAs wurden in Spleißextrakten *in vitro* mit und ohne Zusatz von ATP inkubiert und anschließend auf 15 - 40 %igen Glyceringradienten aufgetrennt. Die Gradienten wurden von unten nach oben in 300 μ l Fraktionen gesammelt und die Fraktionen im Szintillationszähler gemessen. In der graphischen Darstellung ist die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen als % ualer Anteil an der Gesamtaktivität wiedergegeben. Der ATP-abhängige, bei 40S sedimentierende Peak ist mit einem Pfeil markiert.

(A) pBEMAT/WT

(D) pBEMAT-SA6

(B) pBEMAT/S

(E) pBEMAT-SA7

(C) pBEMAT-SA1

(F) pBEMAT-SA12

Signale der 31 und 34 Nukleotide langen cDNA Transkripte zeigten. Wurde der WT Ansatz jedoch 60 Min inkubiert, so konnte korrekt prozessierte *MATa1* mRNA nachgewiesen werden, wie die reversen Transkripte von 37 Nukleotiden Länge belegen. Die ebenfalls auftauchenden unspezifischen cDNA Transkripte, die kleiner als 31 Nukleotide lang sind, rühren sehr wahrscheinlich von im Spleißextrakt degradierten *MATa1* Vorläufer-mRNA Molekülen her.

Das Transkript der Sma-Mutante (S), das die gleiche Intronlänge wie der Wildtyp besitzt, zeigte im wesentlichen auch das gleiche Spleißverhalten, d. h. gleiche Spleißeffizienz und gleiche Spleißprodukte wie der Wildtyp. Eine Verkürzung des Introns um ein Nukleotid ($\Delta 1$), führte zu einer Erniedrigung der Spleißeffizienz, wie aus dem deutlich schwächeren 37 Nukleotide langen Signal zu erkennen ist.

Verkürzte man das Intron um 6, 7 oder 12 Nukleotide ($\Delta 6$, $\Delta 7$, $\Delta 12$), so ließ sich überhaupt keine korrekt gespleißte *MATa1* mRNA nachweisen.

Interessanterweise tauchten jedoch bei allen reversen Transkriptionen, bis auf den Wildtyp-Ansatz mit der 0 Min Kontrolle und dem Ansatz mit dem um 12 Nukleotide verkürzten Intron ($\Delta 12$), ebenfalls cDNA Transkripte mit einer Länge von 42 und 45 Nukleotiden auf, wobei das Signal des 45 Nukleotide langen cDNA Transkripts bei $\Delta 7$ besonders stark war. Diese 42 und 45 Nukleotide langen cDNA Transkripte resultieren möglicherweise von prozessierten mRNAs, die jedoch durch Benutzung von kryptischen 5' Spleißsignalen im ersten Exon des *MATa1* Transkripts entstanden sind. Sollten nämlich diese kryptischen 5' Spleißstellen, die sich bei Position 67 (GUAGU) und Position 70 (GUAUGG) in ersten Exon befinden (siehe Abb. 9), benutzt werden, so entstehen mRNA Moleküle, die nach reverser Transkription cDNA Transkripte von 42 bzw. 45 Nukleotiden Länge liefern. Die Tatsache, daß bei der 0 Min Kontrolle des Wildtyps und bei der $\Delta 12$ -Mutante, bei der ja auch Teile der internen Erkennungsregion ("TACTAAC-Box") deletiert sind, diese cDNA Transkripte nicht zu finden sind, spricht dafür, daß diese kryptischen 5' Spleißstellen im ersten Exon des *MATa1* Gens in vitro benutzt werden. Weitere Experimente zum Nachweis dieser alternativen Spleißprodukte wurden mit Exon 1-verkürzten Mutanten, denen diese kryptischen 5' Spleißsignale fehlen, durchgeführt und werden später in Kapitel 3.1.7 beschrieben.

3.1.5 Vergleich der Spleißreaktion in Extrakten aus α - und α -Zellen

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kann, wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, drei verschiedene Zelltypen besitzen. Jeder Zelltyp besitzt dabei einen für ihn charakteristischen Satz an aktiven bzw. inaktiven Genen. Die Tatsache, daß das *MATa1* Gen zu diesen zelltypspezifisch exprimierten Genen zählt, führte zu der Frage, ob vielleicht auch der

Spleißprozeß dieses Gens zelltypspezifisch abläuft. Bei höheren Eukaryonten wurde eine solche Abhängigkeit des Spleißprozesses bereits für einige Gene gefunden (Laski et al., 1986). Deshalb sollte auch hier untersucht werden, ob die normalerweise nur in a und a/α Zellen zu findende *MATa1* RNA in Speißextrakten aus *MATa* oder *MATα* Hefezellen in unterschiedlicher Weise prozessiert wird.

Die oben beschriebenen *in vitro* Spleißanalysen der Deletionsmutanten waren in einem Spleißextrakt, der aus *MAT α* Hefezellen gewonnen worden war, durchgeführt worden. Damit war bereits gezeigt, daß es grundsätzlich möglich ist, die für *a* und *a/ α* Zellen spezifische *MATa1* RNA in *MAT α* Spleißextrakten korrekt zu prozessieren. Ob jedoch Spleißextrakte aus *a* bzw. α Zellen qualitative Unterschiede bei der Spleißreaktion zelltypspezifischer Gene aufweisen, sollte durch einen Vergleich des Spleißverhaltens und der Spleißprodukte in verschiedenen Extrakten untersucht werden.

Aus diesem Grund wurden die oben beschriebenen Spleißuntersuchungen, die in einem Extrakt aus *MAT α* Zellen durchgeführt worden waren (Abb. 10A), unter den gleichen Bedingungen in einem Extrakt aus *MATa* Zellen wiederholt. Der dafür verwendete Extrakt wurde uns freundlicherweise von Hartmut Halfter (MPI, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Erste Vorexperimente mit Vorläufer-mRNA des Actingens ergaben, daß beide Extrakte ungefähr gleich gute Spleißaktivitäten besaßen (Resultate nicht gezeigt).

Für die Spleißuntersuchungen der *MATa1* Deletionsmutanten wurden nicht-radioaktiv markierte Vorläufer-mRNAs folgender SP6-*MATa1* Fusionskonstrukte verwendet: pBEMAT/WT (WT), pBEMAT/S (S), pBEMAT-S Δ 1 (Δ 1), pBEMAT-S Δ 6 (Δ 6), pBEMAT-S Δ 7 (Δ 7) und pBEMAT-S Δ 12 (Δ 12). Diese Vorläufer-mRNAs wurden im *MATa* Spleißextrakt inkubiert und die Spleißprodukte mittels reverser Transkription mit dem 5'-[³²P]-markierten Oligodeoxynukleotid E2 in Anwesenheit von ddGTP analysiert.

Vergleicht man nun die 0 Min Kontrollansätze in beiden Extrakten (WT in Abb. 10A und 10B), so fällt auf, daß im Extrakt, der aus *a*-Hefezellen gewonnen worden war, bereits ohne Inkubation korrekt gespleißte *MATa1* mRNA zu finden ist. Dies ist offensichtlich auf das Vorhandensein endogener *MATa1* mRNA im Spleißextrakt zurückzuführen. Diese endogen vorliegende *MATa1* mRNA ist sehr wahrscheinlich auch für die schwachen cDNA Transkriptbanden von 37 Nukleotiden Länge bei den Spleißansätzen der Deletionsmutanten Δ 6, Δ 7 und Δ 12 verantwortlich (Abb. 10B). mRNA-Vorläufermoleküle mit Deletionen von 6, 7 oder 12 Nukleotiden zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt dürften somit auch in *a*-Extrakten nicht korrekt spleißbar sein. Genauso wie bereits im α -Extrakt (Abb. 10A), sind die auf alternative Spleißprozesse hinweisenden cDNA Transkripte von 42 und 45 Nukleotiden Länge in allen *in vitro* Spleißansätzen des *a*-Extraktes zu finden. Da Experimente mit anderen *a*- und α -Extrakten gezeigt haben, daß die generell etwas stärkeren Spleißsignale im *a*-Extrakt (Abb. 10B) extraktabhängig und nicht zelltypspezifisch sind, ergeben sich aus diesen Experimenten keine Anzeichen für zelltypspezifisch unterschiedliches Spleißen der *MATa1* Prä-mRNA.

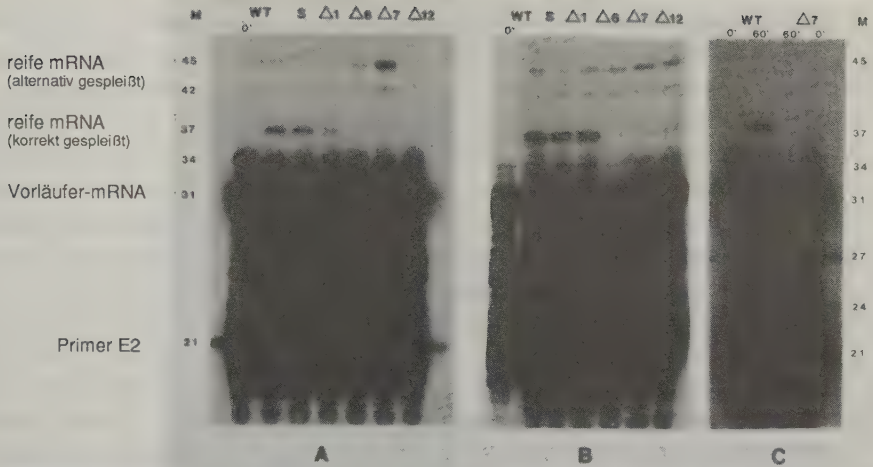


Abb. 10: In vitro Spleißanalysen verschiedener *MATa1* Transkripte mittels reverser Transkription
 SP6-Transkripte von *Mbo*II-verdauten Matrizen-DNAs wurden in Spleißextrakten 60 Min bei 30 °C inkubiert. Die Spleißextrakte wurden aus *MATα* Hefezellen (A und C) und aus *MATa* Hefezellen (B) präpariert. Die RNA wurde nach der Reaktion aus den in vitro Spleißansätzen extrahiert und durch reverse Transkription analysiert. Die reverse Transkription wurde in Gegenwart von ddGTP mit dem 5'-[³²P]-markierten Oligodeoxynukleotid E2 als Primer durchgeführt und die erhaltenen cDNA Produkte auf einem denaturierenden 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. A und B: WT (pBEMAT/WT), S (pBEMAT/S), Δ1 (pBEMAT-SΔ1), Δ6 (pBEMAT-SΔ6), Δ7 (pBEMAT-SΔ7), Δ12 (pBEMAT-SΔ12). C: WT (pRMAT/WT), Δ7 (pRMAT-SΔ7). cDNA Transkripte von 31 und 34 Nukleotiden Länge entstehen aus Vorläufer-mRNAs, während 37 Nukleotide lange cDNA Transkripte von gespleißten mRNAs stammen. 45 und 42 Nukleotide lange cDNA Transkripte können von alternativen Spleißprodukten stammen, die bei Benutzung der kryptischen 5' Spleißstellen im ersten Exon entstehen.

3.1.6 Quantitative Analyse der Spleißeffizienz der Δ1 Mutante

In vitro Spleißanalysen der Deletionmutanten in α -Extrakten hatten darauf hingedeutet, daß die Deletion eines einzigen Nukleotids im Intron zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt bereits zu einer Verringerung der Spleißeffizienz führte. Um diesen Effekt, der in mehreren unabhängigen Experimenten beobachtet wurde, zu quantifizieren, sollten Vorläufer-mRNAs der Deletionsmutanten pBEMAT-SΔ1, pBEMAT-SΔ7 und des Wildtyp-Konstruktes pBEMAT/WT, die jedoch beide intervenierende Sequenzen des *MATa1* Gens besaßen, in vitro synthetisiert werden. Das Spleißverhalten des zweiten Introns sollte dann als interne Referenz zur Quantifizierung der Spleißeffizienz des ersten Introns dienen. Die entsprechenden SP6-*MATa1* Fusionskonstrukte wurden deshalb mit *Bst*NI komplett geschnitten (vgl. Abb. 12), gereinigt und in vitro transkribiert. Die drei verschiedenen

Vorläufer-mRNA Transkripte (WT: 300 fMol, $\Delta 1$: 200 fMol, $\Delta 7$: 200 fMol) wurden in α -Spleißextrakten inkubiert (1/3 der WT-Reaktion wurde vor der Inkubation als 0 Min Wert gestoppt) und durch zwei verschiedene reverse Transkriptionen analysiert. Dazu wurden die ethanolpräzipitierten Spleißansätze in Wasser gelöst und gleiche Volumina jedes Ansatzes für reverse Transkriptionen verwendet.

In einem Fall wurde die Reaktion mit dem für das zweite Exon im *MATa1* Gen spezifischen 5'-[32P]-markierten Oligodeoxynukleotid E2 in Anwesenheit von ddCTP gestartet. In diesem Fall wurden von mRNA-Vorläufern cDNA Transkripte von 29 (erster Stop) und 54 (zweiter Stop) Nukleotiden Länge erwartet. Von korrekt gespleißter *MATa1* mRNA sollten cDNA Transkripts von 61 Nukleotiden Länge entstehen.

Die 0 Min Kontrolle des Wildtyp-Konstruktes (Abb. 11, WT) zeigte sehr deutlich, daß große Mengen an RNA mit ungespleißtem ersten Intron vorlagen (Signale bei 29 und 54 Nukleotiden Länge). Nach der Inkubation tauchten sowohl beim Wildtyp als auch bei der $\Delta 1$ -Mutante, jedoch nicht bei der $\Delta 7$ -Mutante signifikante Mengen an 61 Nukleotide langen cDNA Transkripten auf, die auf RNA Moleküle mit korrekt gespleißtem ersten Intron hinwiesen. Mögliche alternative Spleißprodukte zu den kryptischen 5' Spleißstellen im ersten Exon sind bei diesem experimentellen Ansatz nicht nachzuweisen, da die entsprechenden cDNA Transkripte (31 bzw. 35 Nukleotide lang) mit unspezifischen Degradationsprodukten komigrieren.

Sofern die reverse Transkription mit dem radioaktiv markierten Oligodeoxynukleotid E3 in Anwesenheit von ddGTP durchgeführt wurde, erwartet man für Vorläufer-mRNA ein cDNA Transkript von 33 Nukleotiden Länge und für gespleißte mRNA ein 38 Nukleotide langes cDNA Transkript. In Abb. 11 sind die Ergebnisse solcher Analysen gezeigt.

Bei allen drei Ansätzen war zu erkennen, daß große Mengen an Vorläufer-mRNAs vorlagen, deren zweites *MATa1* Intron nicht herausgeschnitten ist (33 Nukleotide lange cDNA). Bei allen Konstrukten konnten außerdem jeweils geringe Mengen an mRNAs nachgewiesen werden, bei denen das zweite Intron korrekt entfernt wurde (38 Nukleotide lange cDNA). Die Spleißeffizienz des zweiten *MATa1* Introns scheint somit in vitro deutlich niedriger zu sein als die des ersten Introns. Aufgrund dieser niedrigen Spleißeffizienz des zweiten Introns erschienen die entsprechenden cDNA Transkripte auch nicht als geeigneter interner Standard für die Ermittlung der Spleißeffizienz des ersten Introns. Die Spleißeffizienzen der Konstrukte mit verschiedenen langen Intronsequenzen (WT und $\Delta 1$) wurden deshalb im Vergleich zur Menge an RNA mit unprozessiertem ersten Intron bestimmt. Ein quantitativer Vergleich der Intensität des Signals, das durch gespleißte mRNA (61 Nukleotide) hervorgerufen wurde, mit der des Signals, das durch ungespleißte Vorläufer-mRNA (zweiter Stop bei 54 Nukleotiden) entsteht, durch "Scannen" des Autoradiogramms, zeigte, daß die Reduktion der Intronlänge um ein Nukleotid bereits eine Reduktion der Spleißeffizienz um 60 % zur Folge hatte.

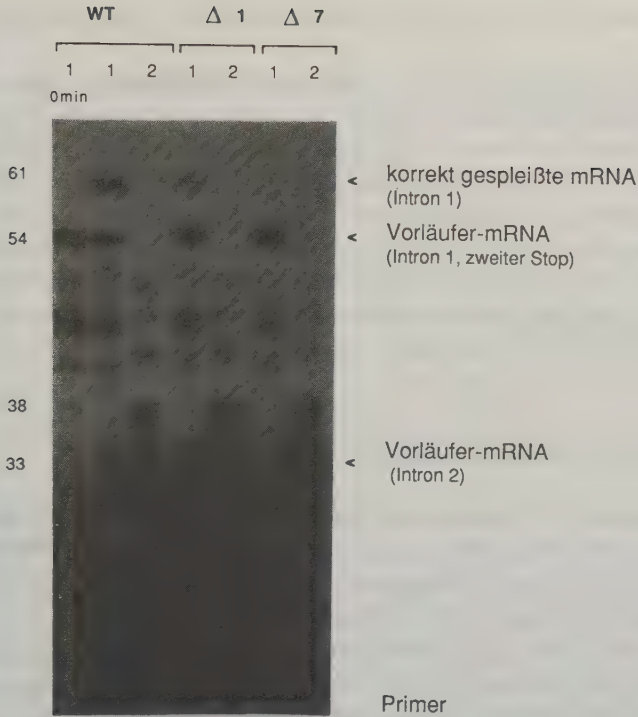


Abb. 11: Quantitative Analyse der Spleißeffizienz der $\Delta 1$ -Mutante

SP6-Transkripte von BstNI-verdauten Matrizen DNAs (WT: pBEMAT/WT, $\Delta 1$: pBEMAT- $\Delta 1$, $\Delta 7$: pBEMAT- $\Delta 7$), die beide Intronsequenzen enthielten, wurden 0 bzw. 60 Min mit 30 °C in Spleißextrakten aus *MAT α* Hefezellen inkubiert. Aus den in vitro Spleißreaktionen wurde die RNA extrahiert und in zwei gleiche Hälften geteilt. Ein Teil der RNA wurde mit dem 5'-[32 P]-markierten Oligodeoxynukleotid E2 in Gegenwart von ddCTP revers transkribiert (1). Der andere Teil wurde mit dem 5'-[32 P]-markierten Oligodeoxynukleotid E3 in Gegenwart von ddGTP transkribiert (2). Die erhaltenen cDNA Produkte wurden auf einem denaturierenden 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographiert. 61 Nukleotide lange cDNA Transkripte (1) stammen von mRNAs mit korrekt entferntem ersten Intron. 54 Nukleotide lange Transkripte entstehen durch reverse Transkription einer Vorläufer-mRNA, die das erste Intron noch enthält, wobei die Transkription erst am zweiten Guanosinrest in der Matrize abbricht. Das 33 Nukleotide lange cDNA Transkript (2) stammt von einer Vorläufer-mRNA, deren zweites Intron noch vorhanden ist; das 38 Nukleotide lange Transkript resultiert aus einer RNA mit korrekt herausgeschnittenem zweiten Intron.

3.1.7 Spleißanalysen von *MATa1* Transkripten mit verkürztem ersten Exon

Ein wichtiges Ergebnis der *in vitro* Spleißanalysen der Intron-Deletionsmutanten war das Auftreten alternativer Spleißprodukte, die aus der Benutzung kryptischer 5' Spleißstellen im ersten Exon entstanden waren. Um die Existenz dieser alternativen *in vitro* Spleißprodukte zu untermauern, sollten Kontrollexperimente mit Vorläufer-mRNAs durchgeführt werden, die diese kryptischen 5' Spleißsignale nicht besaßen. Vorausgesetzt, daß die 42 und 45 Nukleotide langen cDNA Transkripte ausschließlich auf die Existenz alternativ gespleißter mRNAs zurückzuführen waren, dürften bei *in vitro* Spleißanalysen von Vorläufer-mRNAs mit verkürztem ersten Exon, das diese kryptischen 5' Spleißstellen nicht mehr enthielt, diese cDNA Transkripte nicht auftauchen.

3.1.7.1 Verkürzung des ersten *MATa1* Exons

Die kryptischen 5' Spleißstellen bei Position 67 und 70 (vgl. Abb. 9) konnten durch die Deletion eines Teils des ersten Exons entfernt werden. Dies wurde durch die Subklonierung eines ca. 530 bp langen *RsaI* Fragments aus den pSP64-*MATa1* Fusionskonstrukten in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pSP64 erreicht (vgl. Abb. 12). Dazu wurden die ca. 530 bp großen *RsaI* Fragmente aus pBEMAT/WT, pBEMAT- Δ 7 und pBEMAT- Δ IVS1 aus "Low Melting Point"-Agarosegelen isoliert und mit einem mit *SmaI* linearisierten und mit alkalischer Phosphatase behandelten pSP64 Vektor verknüpft. Nach erfolgter Transformation in transformationskompetente *E. coli* JM109 Zellen wurden rekombinante, ampicillin-resistente Klone selektiert. Durch Restriktionsanalysen mit *Bam*HI, *Eco*RI, *Sma*I und *Bgl*II wurden die Klone näher charakterisiert und solche ausgewählt, die die *MATa1* Insertion in der richtigen Orientierung bezüglich des SP6 Promotors trugen. Wie in Abb. 12 zu erkennen ist müssen diese Klone ein ca. 400 bp großes *Bam*HI-*Bgl*II Fragment besitzen. Diese neuen *MATa1*-pSP64 Fusionskonstrukte tragen ein um 72 bp verkürztes erstes *MATa1* Exon. Auf Grund dieser Deletionen fehlen jeweils auch die kryptischen 5' Spleißstellen. Wurden von diesen Konstrukten (pRMAT/WT, pRMAT/S, pRMAT- Δ 7, pRMAT- Δ IVS1) Vorläufer-mRNAs *in vitro* synthetisiert, so besaßen diese Transkripte im ersten Exon keine kryptischen 5' Spleißstellen (vgl. Abb. 9).

3.1.7.2 Nachweis der Spleißprodukte

Für *in vitro* Spleißanalysen wurden von den SP6-*MATa1* Fusionskonstrukten nicht-radioaktiv markierte Vorläufer-mRNAs *in vitro* synthetisiert. Als Matrizen dafür dienten die

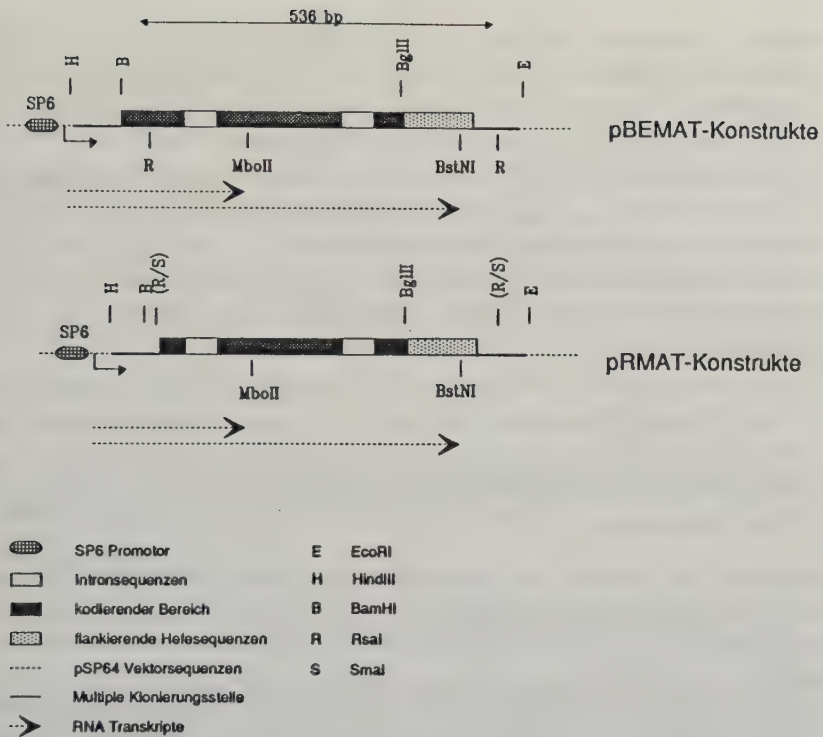


Abb. 12: Schematische Darstellung der SP6-MATa1 Fusionskonstrukte

Alle pBEMAT-Konstrukte sind pSP64-MATa1 Fusionen, die das gesamte erste Exon des MATa1 Gens besitzen. Alle pRMAT-Konstrukte sind ebenfalls pSP64-MATa1 Fusionen, bei denen jedoch jeweils 72 Nukleotide des ersten MATa1 Exons deletiert sind. Die pRMAT-Konstrukte enthalten somit nicht die kryptischen 5' Spleißstellen im ersten Exon. Durch Restriktionsspaltungen mit MboII oder BstNI können sowohl von den pBEMAT-, als auch von den pRMAT-Konstrukten DNA-Matrizen für SP6 in vitro Transkriptionen erhalten werden. Von MboII-gespaltener Matrizen-DNA werden in vitro Transkripte erhalten, die nur das erste MATa1 Intron mit flankierenden Exonsequenzen enthalten. Von BstNI-gespaltener Matrizen-DNA erhält man Transkripte, die beide Introns mit ihren flankierenden Exonsequenzen enthalten.

mit MboII-geschnittenen Plasmide pRMAT/WT und pRMAT-SA7. Die Vorläufer-mRNAs, die von den beiden Konstrukten synthetisiert worden waren, wurden in α -Extrakten 0 bzw. 60 Min inkubiert und durch reverse Transkription mit dem 5'-[32 P]-markierten Oligodeoxynukleotid E2 in Gegenwart von ddGTP analysiert.

Das Ergebnis der reversen Transkription ist in Abb. 10C gezeigt. Bei 0 Min Inkubation im Spleißextrakt fand man kein reifes mRNA Produkt, nur ungespleißtes Ausgangsmaterial (31 und 34 Nukleotide lange cDNAs). Nach einer Inkubation von 60 Min ließ sich korrekt gespleißtes Material aufgrund eines cDNA Transkriptes von 37 Nukleotiden Länge nur bei dem Transkript das die Original-Intronsequenz (WT) enthält, nachweisen. Das Transkript mit

dem um 7 Nukleotide verkürzten Intron ($\Delta 7$), lieferte analog zu den pBEMAT-Transkripten keine korrekt prozessierte *MATa1* mRNA. Ein 45 oder 42 Nukleotide langes cDNA Transkript, das auf ein alternativ gespleißtes Produkt hingewiesen hätte, wurde in diesem Experiment ebenfalls in keinem der beiden Ansätze gefunden.

Die Existenz des 42 Nukleotide langen cDNA Transkriptes, das nur in Abhängigkeit vom kryptischen 5' Spleißsignals bei Position 67 (siehe Abb. 9) entsteht, blieb jedoch unklar, weil bei starker Überexposition des Autoradiogramms doch eine geringe Menge an 42 Nukleotide langen cDNA Transkript zu erkennen war (nicht gezeigt). Deutlicher war diese cDNA jedoch in einem späteren Experiment mit dem gleichen Konstrukt (pRMAT- $\Delta 7$) zu sehen (vgl. Abb. 15, Spur 5).

Durch diese Ergebnisse konnte somit jedoch zumindest für die kryptische 5' Spleißstelle bei Position 70 nachgewiesen werden, daß sie in vitro als solche erkannt und benutzt wird. Im folgenden soll deshalb nur noch von einem alternativen Spleißprodukt gesprochen werden, trotz der Möglichkeit, daß beide kryptischen 5' Spleißstellen zu alternativen Spleißprodukten in vitro führen könnten.

3.1.7.3 Untersuchungen zur Bildung von Spleißkomplexen

Die Analyse des in vitro Spleißprozesses mittels reverser Transkription der Spleißsubstrate und -produkte gibt nur Aufschlüsse über die Endprodukte des Spleißprozesses. Der Hefe mRNA Spleißprozeß läßt sich jedoch in mehrere diskrete Reaktionsschritte (schrittweise Assoziation von snRNPs und Vorläufer-mRNA, Schnitt am 5' Ende, Ausbildung der lassoförmigen Struktur, Schnitt am 3' Ende, Exonverknüpfung) unterteilen. Um die dabei entstehenden Zwischenprodukte nachweisen zu können, bedarf es anderer Analysemethoden. Eine davon ist die bereits erwähnte und beschriebene Methode der Analyse von Spleißkomplexen auf Glycerringradienten. Solch eine Analyse erlaubt Aussagen darüber, ob ein mRNA-Vorläufer in der Lage ist, einen Spleißkomplex zu bilden oder nicht. Genau diese Frage sollte für den Fall des pRMAT- $\Delta 7$ Konstrukts beantwortet werden, da durch Spleißanalysen mittels reverser Transkription keine reifen mRNAs dieser Mutante nachgewiesen werden konnten.

Deshalb wurden Glycerringradienten-Analysen mit mRNA-Vorläufern der Konstrukte pRMAT/WT, pRMAT- Δ IVS1, pRMAT- $\Delta 7$ und pBEMAT- $\Delta 7$ durchgeführt. Als Matrize für die in vitro Synthese der Vorläufer-mRNA Transkripte dienten jeweils die mit MboII geschnittenen Plasmid-Konstrukte. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 13 gezeigt. Obwohl im Falle des pRMAT/WT-Konstruktes (Abb. 13a) die kryptischen 5' Spleißstellen fehlten, bildete sich trotzdem ein ATP-abhängiger Spleißkomplex aus, da die Intronsequenz unverändert war. Verwendete man bei der Analyse ein RNA Transkript das kein Intron enthält (pRMAT- Δ IVS1), so bildete sich in Anwesenheit von ATP kein

Spleißkomplex aus (Abb. 13c). Das Transkript von pRMAT- $\Delta 7$, das ein um 7 Nukleotide verkürztes Intron und ein verkürztes Exon, welches die kryptische 5' Spleißstelle nicht mehr enthält, besitzt, führte ebenfalls nicht zu einem ATP-abhängigen 40S Spleißkomplex (Abb. 13d). Ein ATP-abhängiger Spleißkomplex wurde jedoch gebildet, wenn ein mRNA-Vorläufer verwendet wurde, der eine Deletion von 7 Nukleotiden im Intron, jedoch auch eine kryptische 5' Spleißstelle im Exon enthält (Abb. 13b).

Diese Ergebnisse belegen zum einen nochmals die aktive Beteiligung des kryptischen 5' Spleißsignals am Spleißprozeß. Zum anderen zeigen sie, daß ein Transkript, in dessen Intron der Abstand zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt eine gewisse Mindestlänge unterschreitet, kein geeignetes Substrat für die Bildung eines Spleißkomplexes ist.

3.1.8 Spleißanalyse eines Transkripts mit einer längenkompensatorischen Mutation zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt

Die bisher beschriebenen Auswirkungen der Deletionen im Intron auf den Spleißprozeß konnten zwei Ursachen haben. Zum einen war es möglich, daß durch die Deletionen wichtige Sequenzmotive des Introns für die Spleißreaktion betroffen waren. Dies hätte jedoch bedeutet, daß zu den bereits bekannten konservierten Spleißsignalen zusätzliche Erkennungssequenzen nötig sind. Andererseits konnte es sich auch um einen Längeneffekt handeln, d. h. durch die Deletionen wurde der Abstand der Erkennungssignale (5' Spleißstelle - interner Verzweigungspunkt - 3' Spleißstelle) derart verringert, daß eine notwendige Minimaldistanz unterschritten wurde.

Um dies zu untersuchen, wurde eine längenkompensatorische Mutation zum pBEMAT- $\Delta 7$ Konstrukt erzeugt. Die Transkripte aus diesem Konstrukt besaßen die gleiche Intronlänge und die gleichen Abstände zwischen den Erkennungssignalen wie die Transkripte des WT-Konstrukts. Jedoch waren genau die 7 Nukleotide, die in der $\Delta 7$ -Mutante deletiert worden waren, durch zum Wildtyp komplementäre Sequenzen ersetzt.

3.1.8.1 Erzeugung der kompensatorischen Mutante 7C

Das Ziel der Mutagenese war also, den von der $\Delta 7$ -Deletion betroffenen Bereich durch die zum Wildtyp komplementäre Sequenz zu ersetzen. Das heißt, es sollte die im Wildtyp zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt vorhandene Sequenz 'ATAGCCT' durch die Sequenz 'TATCGGA' ersetzt werden (vgl. Abb. 7A). Diese Veränderung wurde durch in vitro Mutagenese im M13 System erzielt, wobei das

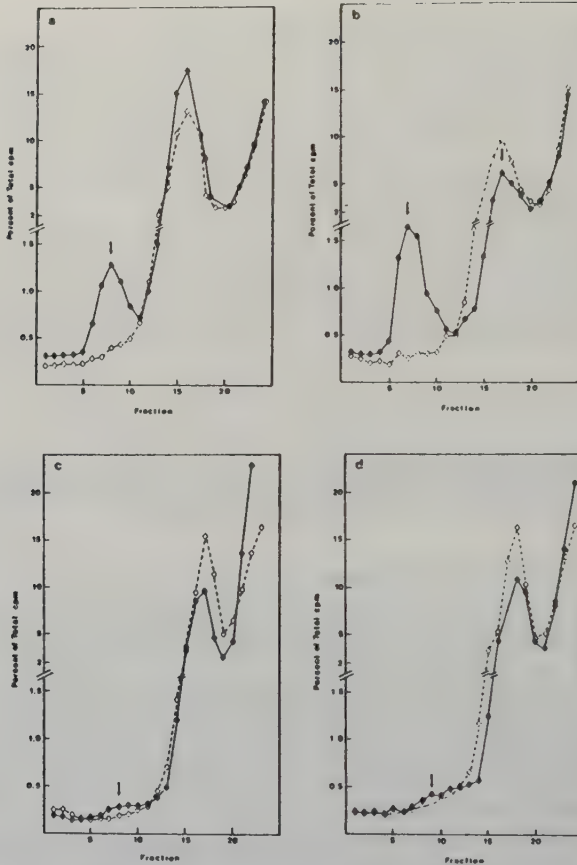


Abb. 13: Nachweis von Spleißkomplexen auf Glyceringradienten

[32 P]-markierte Vorläufer-mRNAs wurden *in vitro* von den mit MboII-geschnittenen Plasmiden pRMAT/WT (a), pBEMAT-SA7 (b), pRMAT/ Δ IVS1 (c) und pRMAT-SA7 (d) erzeugt und 15 Min bei 30 °C in MAT α -Spleißextrakten mit (●) und ohne (○) ATP inkubiert. Glyceringradienten (15 - 40 %) wurden mit den *in vitro* Spleißansätzen überschichtet und zentrifugiert. Die Gradienten wurden dann von unten nach oben fraktioniert und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen. Die Verteilung der Radioaktivität über den Gradienten ist in der Abbildung als Kurve dargestellt, wobei die Aktivität in % der Gesamtaktivität angegeben ist. Die auftretenden ATP-abhängigen Spleißkomplexe sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Oligodeoxynukleotid 7C (5'-GTTAGTAAATTGATTCAAtccgataCCTTGAATGAAAAC-3') als Primer diente. Als Matrize wurde einzelsträngige rekombinante M13 Phagen-DNA, isoliert aus pBMAT13/WT, verwendet. Die Mutagenese wurde ohne Selektion auf den mutagenisierten Strang durchgeführt. Die Identifizierung der mutagenisierten M13 Phagen erfolgte durch Plaquehybridisierung mit dem 5'-[32 P]-markierten Oligodeoxynukleotid 7C. Aus zwei positiv hybridisierenden Phagenplaques (pBMAT13-7C) wurde doppelsträngige

DNA präpariert und daraus die ca. 630 bp großen BamHI-EcoRI Fragmente über ein "Low Melting Point"-Agarosegel isoliert. Die Subklonierung in den pSP64 Vektor erfolgte so wie sie für die anderen BamHI-EcoRI Fragmente oben beschrieben wurde. Nach der Subklonierung in pSP64 wurde durch Plasmidsequenzierung mit dem *MATa1* spezifischen Primer E2 der Austausch der 7 Nukleotide in dem Konstrukt pBEMAT-7C bestätigt (vgl. Abb. 14).

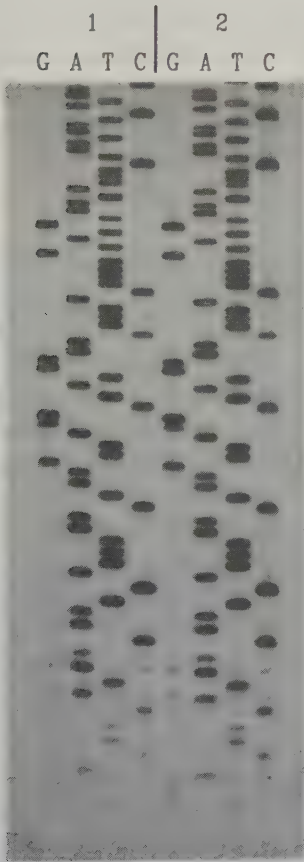


Abb. 14: Sequenzanalyse des Klon pBEMAT-7C
Die gezeigte Sequenzierung zweier pBEMAT-7C Klone erfolgte durch Plasmidsequenzierung mit Sequenase und dem *MATa1* spezifischen Oligodeoxynukleotid E2 als Primer. Durch die Sequenzanalyse konnte der Austausch von 7 Nukleotiden zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt durch 7 komplementäre Nukleotide nachgewiesen werden (ATAGCCT → TATCGGA).

3.1.8.2 Analyse der Spleißprodukte

Spleißanalysen mit RNA-Transkripten des Konstruktes pBEMAT-7C wurden analog zu den bisher beschriebenen Analysen mittels reverser Transkription mit dem 5'-[³²P]-markierten

Oligodeoxynukleotid E2 in Anwesenheit von ddGTP durchgeführt. Abb. 15 (Spuren 1 - 3) zeigt das Ergebnis dieses Experiments, bei dem als Kontrolle nochmals das Spleißverhalten des Wildtyps und der um 7 Nukleotide verkürzten Intronsequenz gezeigt ist (Spur 1: pBEMAT/WT, Spur 2: pBEMAT- Δ 7). Während das Wildtyp-Konstrukt zusätzlich zum korrekt prozessierten Spleißprodukt (37 Nukleotide) auch das zur kryptischen 5' Spleißstelle prozessierte Produkt (45 Nukleotide) lieferte, war bei der Δ 7-Mutante nur das zur kryptischen 5' Spleißstelle prozessierte Produkt nachzuweisen. Die kompensatorische Mutante 7C (Spur 3: pBEMAT-7C), zeigte hingegen das gleiche Spleißverhalten wie der Wildtyp. Dies bedeutet, daß der Bereich der Δ 7-Deletion keine für die Spleißreaktion essentielle Nukleotidsequenz enthalten kann. Außerdem wurde daraus ersichtlich, daß dieser Bereich nicht bei der Bildung wichtiger Sekundärstrukturen beteiligt sein kann, da der Austausch dieser Sequenzen keinen Effekt auf die Spleißfähigkeit der Vorläufer-mRNA hat.

3.1.9 Spleißanalyse einer längenkompensatorischen Mutation zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle

Die *in vitro* Spleißanalysen der 7C-Mutante hatten gezeigt, daß die Reduktion der Intronlänge um 6 oder 7 Nukleotide zu einem Spleißdefekt führt, der nur durch die verringerte Länge des Introns zu erklären war. Unbeantwortet von den bisherigen Experimenten war jedoch die Frage, ob die Gesamtlänge des Introns oder der Abstand zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt darüber entscheidet, ob ein Intron herausgeschnitten werden kann oder nicht. Um diese Frage beantworten zu können, wurde eine weitere Intronmutante erzeugt. Ausgehend von der Δ 7-Mutante wurden zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle 7 Nukleotide inseriert, so daß die Gesamtlänge des Introns der des Wildtyps entsprach, der Abstand zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt jedoch um 7 Nukleotide gegenüber der Wildtypsequenz verkürzt war.

3.1.9.1 Erzeugung der kompensatorischen Mutante Δ 7A

Eine kompensatorische Mutante, bei der die sieben zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt deletierten Nukleotide zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle wieder inseriert waren, wurde ausgehend von dem Konstrukt pRMAT- Δ 7 erzeugt. Aus diesem Konstrukt wurde ein ca. 530 bp großes BamHI-EcoRI Fragment aus einem "Low Melting Point"-Agarosegel isoliert und mit dem mit BamHI und EcoRI geschnittenen Vektor pMc58/R verknüpft. Die Transformation erfolgte wie in Kapitel 6.19.1

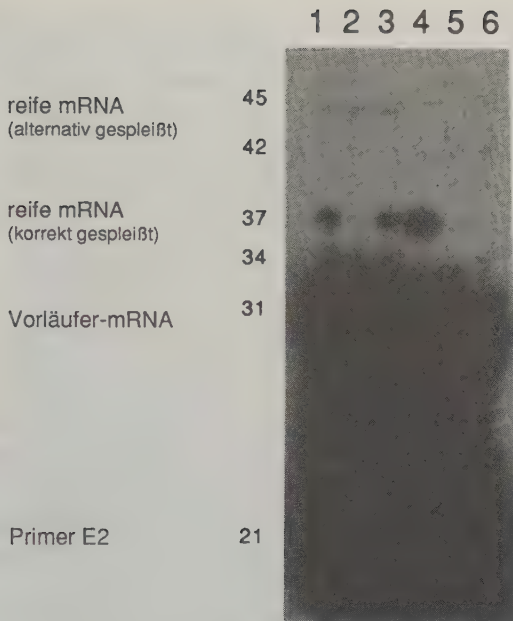


Abb. 15: Analyse der in vitro Spleißreaktion der kompensatorischen Mutanten 7C und $\Delta 7A$

Die reversen Transkriptionsanalysen der in vitro gespleißten *MATa1*-Konstrukte wurden mit dem 5'-[^{32}P]-markierten Oligodeoxynukleotid E2 in Gegenwart von ddGTP durchgeführt. cDNA Transkripte von 31 und 34 Nukleotiden Länge entsprechen Vorläufer-mRNA Molekülen; 37 Nukleotide lange cDNA Transkripte stammen von reifen mRNA Molekülen. Alternativ, d. h. zu der kryptischen 5' Spleißstelle im ersten Exon gespleißtes Produkt führt zu einem 45 Nukleotide langen cDNA Transkript. (1) pBEMAT/WT, (2) pBEMAT- $\Delta 7$, (3) pBEMAT-7C, (4) pRMAT/WT, (5) pRMAT- $\Delta 7$, (6) pMaMAT- $\Delta 7A$.

beschrieben in transformationskompetente *E. coli* WK6 Zellen. Nach Selektion auf LB-Chloramphenicol-Platten wurde von einem der erhaltenen rekombinanten chloramphenicol-resistenten Klone, welcher die ca. 530 bp großen *MATa1* Insertion enthielt (pMcMAT- $\Delta 7$), einzelsträngige DNA präpariert. Mit Hilfe der "gapped duplex DNA"-Mutagenese wurde die längenkompensatorische Mutante erzeugt. Als mutagener Primer diente das Oligodeoxynukleotid $\Delta 7A$ (5'-CCATTATAAACTGAAaggctatGTATTGTTAGTAAATT-3'). Eine Selektion auf den neusynthetisierten Strang wurde durchgeführt, indem auf ampicillinresistente Klone selektioniert wurde. Aufgrund dieser Vorselektion war es nicht notwendig, positiv hybridisierende Klone mit dem 5'-[^{32}P]-markierten Oligodeoxynukleotid $\Delta 7A$ zu identifizieren. Aus vier ampicillinresistenten Klonen wurde durch Plasmidminipräparation doppelsträngige DNA isoliert und durch Sequenzierung mit dem

MATa1 spezifischen Primer E2 charakterisiert. Zwei der Klone trugen die gewünschte 7 Nukleotide lange Insertion zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle. Die zwei restlichen Klone entsprachen dem unmutagenisierten Ausgangsprodukt. Die Intronsequenz des mutagenisierten Klons pMaMAT- Δ 7A ist in Abb. 7A und das Autoradiogramm der Sequenzanalyse in Abb. 15 gezeigt.

Vorläufer-mRNAs für in vitro Spleißanalysen konnten direkt von diesem pMaMAT- Δ 7A Konstrukt erzeugt werden, da, wie in den pSP64-MATa1 Fusionskonstrukten, der SP6 Promotor die in vitro RNA Synthese ermöglichte.

3.1.9.2 Analyse der Spleißprodukte

Das in vitro Spleißverhalten der Δ 7A-Mutante sollte zunächst durch reverse Transkription untersucht werden. Dazu wurden die Plasmide pMaMAT- Δ 7A, pRMAT/WT und pRMAT-S Δ 7 mit MboII komplett geschnitten und als Matrize für SP6 Transkriptionen verwendet. Die in vitro synthetisierten Vorläufer-mRNAs wurden in α -Spleißextrakten inkubiert und mit dem 5'-[³²P]-markierten Oligodeoxynukleotid E2 in Gegenwart von ddGTP als spezifischem Stopnukleotid analysiert.

Das Ergebnis der reversen Transkription des Kontrollansatzes (pRMAT/WT) mit der Intronsequenz des Wildtyps ist in Spur 4 der Abb. 15 gezeigt. Man erkennt an dem cDNA Transkript von 37 Nukleotiden Länge, daß ausschließlich korrekt gespleißte mRNA vorlag. Auch bei starker Überexposition ließen sich keine Spuren von alternativ gespleißter mRNA nachweisen (45 Nukleotide). In Spur 5 ist das in vitro Spleißverhalten eines RNA Transkriptes gezeigt, dessen Intron um 7 Nukleotide verkürzt ist und das zudem auch keine kryptischen 5' Spleißstellen besitzt (pRMAT-S Δ 7). Bei dieser Mutante fand man weder korrekt noch alternativ gespleißte mRNA (cDNAs von 37 und 45 Nukleotiden Länge). Die Analyse des Spleißverhaltens der Δ 7A-Mutante (Spur 6) ergab ebenfalls keine Hinweise auf korrekt oder alternativ gespleißte Produkte. Obwohl die Gesamtlänge des Introns im Δ 7A-Konstrukt der des Wildtyps entsprach, war die Spleißreaktion trotzdem blockiert.

Dies bedeutet, daß nicht die Gesamtlänge des Introns, sondern die Distanz zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt für die Spleißreaktion ausschlaggebend ist. Unterschreitet diese Distanz eine bestimmte Minimallänge, so ist eine Spleißreaktion nicht mehr möglich.

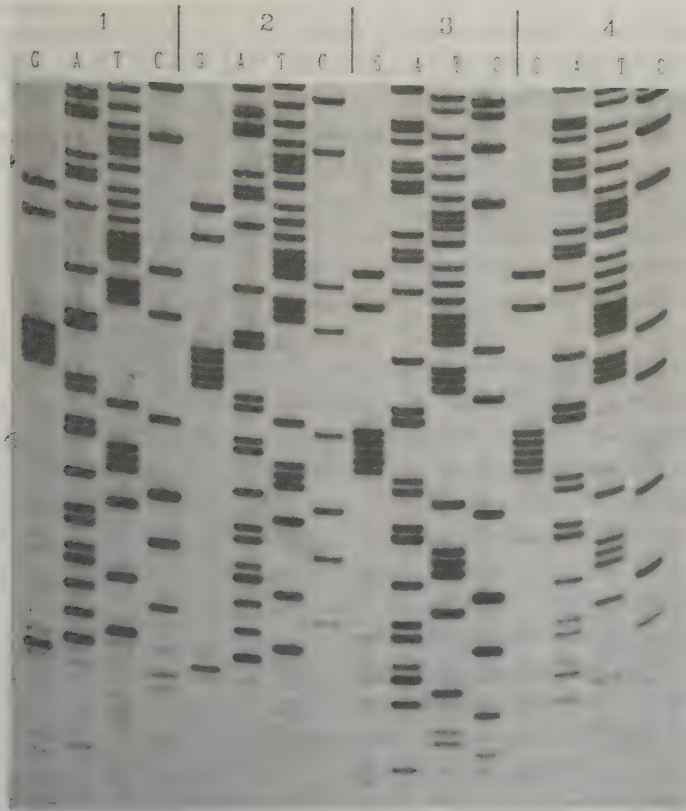


Abb. 16: Sequenzanalyse potentieller $\Delta 7A$ -Mutanten

Aus vier ampicillinresistenten Transformanten wurde doppelsträngige DNA isoliert und durch Plasmidsequenzierung mit Sequenase die Nukleinsäuresequenz ermittelt. Als Primer wurde das *MATa1* spezifische Oligodeoxynukleotid E2 benutzt. Während Klon 1 und Klon 2 die Insertion von 7 Nukleotiden (ATAGCCT) zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle besitzen, zeigen Klon 3 und 4 die unmutagenisierte Ausgangssequenz.

3.1.10 Analyse der Spleißkomplexe in einem nativen Gelsystem

Die Analyse von Spleißkomplexen auf nativen Gelen bietet die Möglichkeit eine der ersten Reaktionen des Spleißprozesses, nämlich die Bildung des Spleißkomplexes in diskreten Stufen zu analysieren. Die in Kapitel 3.1.7.1 gezeigten Glyceringradienten-Analysen hatten bereits gezeigt, daß keine intakten 40S Spleißkomplexe entstehen können, wenn die

notwendige Minimaldistanz zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt unterschritten wird. Durch native Gelelektrophorese sollte deshalb überprüft werden, ob bei Unterschreitung dieser Mindestdistanz die Bildung von Vorstufen des Spleißkomplexes ebenfalls verhindert ist.

Aus diesem Grund wurden zunächst radioaktiv markierte Vorläufer-mRNAs *in vitro* synthetisiert. Als Matrice dafür dienten die mit MboII-geschnittenen Konstrukte pRMAT-SA7 und pRMAT/WT. Die dabei entstandenen mRNA-Vorläufermoleküle enthielten nur einen Teil des ersten Exons (ohne kryptische 5' Spleißstelle) und im Falle der $\Delta 7$ -Mutante ein im Vergleich zum WT-Konstrukt um 7 Nukleotide verkürztes Intron. Beide Vorläufer-mRNAs wurden in α -Spleißextrakten inkubiert und auf nativen Polyacrylamid-Agarosegelen analysiert.

Abb. 17 zeigt das Ergebnis dieses Experimentes. Vorläufer-mRNAs mit der Wildtyp-Intronsequenz bildeten bereits nach wenigen Minuten Prä-Spleißkomplexe aus. Kontrollexperimente, die ohne Zugabe von ATP durchgeführt wurden, zeigten, daß diese in Abb. 17 mit S bezeichneten Komplexe ATP-abhängige Prä-Spleißkomplexe waren. Der in der Abb. 17 mit N bezeichnete Komplex entstand ATP-unabhängig (nicht gezeigt). Die Analyse der Doppelmutante (pRMAT-SA7) mit verkürztem Intron und verkürztem Exon ergab jedoch keinerlei Hinweise darauf, daß ausgehend von diesem Transkript Spleißkomplexe erzeugt werden können. Auch bei extremer Überexposition fanden sich keine spleißspezifischen Retardationsprodukte.

Aus dem Fehlen dieser frühen Spleißkomplexe muß geschlossen werden, daß bereits für die erste Stufe der Spleißreaktion, die Bildung von "Prä-Spleißkomplexen", eine Mindestdistanz zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt notwendig ist.

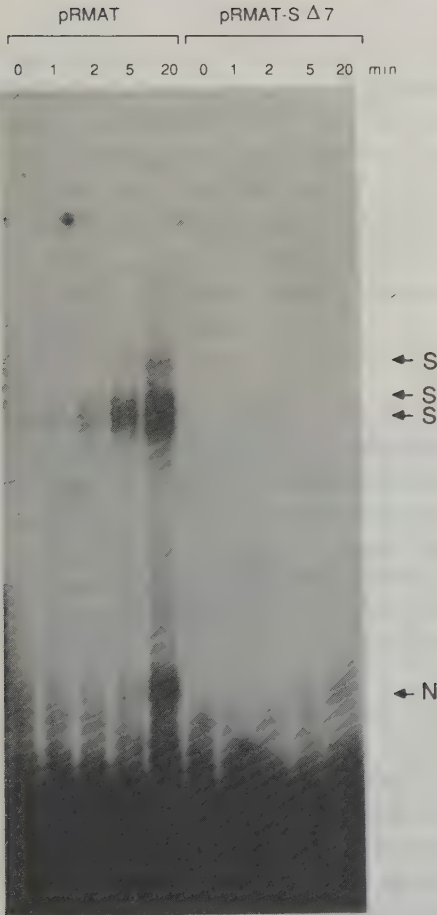


Abb. 17: Nachweis von "Prä-Spleiß-komplexen" durch native Gelelektrophorese [32P]-markierte Vorläufer-mRNAs von MboII-gespaltenen pRMAT/WT und pRMAT-SΔ7 Konstrukten wurden in MAT α -Spleißextrakten bei 30 °C inkubiert. Nach 0, 1, 2, 5, und 20 Min wurden Aliquote entnommen, mit Heparin-Puffer gestoppt und auf nativen Polyacrylamid-Agarosegelen aufgetrennt. S: ATP abhängige Spleißkomplexe; N: ATP-unabhängiges Retardationsprodukt.

3.2 Nachweis alternativer Spleißprodukte in vivo und Untersuchungen zu einer möglichen Funktion der Introns im *MATa1* Gen

Ziel der in vivo Spleißanalysen war es nicht, alle in vitro durchgeführten Experimente in vivo zu reproduzieren. Es sollten vielmehr die biologisch relevanten Aspekte des Spleißprozesses im Vordergrund stehen. Deshalb konzentrierten sich die in vivo Spleißanalysen in erster Linie auf mögliche alternative Spleißprozesse. Es sollte zum einen untersucht werden, ob die in vitro entdeckten alternativen *MATa1* mRNA Spleißprodukte auch in vivo auftreten. Zum anderen sollte, falls es diese alternativen Produkte in vivo gibt, überprüft werden, ob sie essentiell sind, bzw., ob sie eine biologische Funktion besitzen.

3.2.1 Nachweis alternativer *MATa1* Spleißprodukte in vivo

Die Untersuchungen zum Nachweis möglicher alternativer Spleißprodukte in vivo wurden analog zu den in vitro Spleißanalysen durchgeführt, indem Hefe-Gesamt-RNA oder Poly(A)+RNA als Matrize für reverse-Transkriptions-Experimente benutzt wurde. Als Primer diente entweder das für das zweite oder das für das dritte Exon spezifische, jeweils am 5' Ende mit [³²P]-markierte Oligodeoxynukleotid E2 oder E3. Dideoxyguanosintriphosphat (ddGTP) bzw. Dideoxycytidintriphosphat (ddCTP) dienten als spezifische Kettenabbruchnukleotide, je nachdem welche Spleißprodukte identifiziert werden sollten.

3.2.1.1 Nachweis einer zu der kryptischen 5' Spleißstelle gespleißten *MATa1* mRNA

In vitro Spleißanalysen hatten gezeigt, daß bei Anwesenheit der kryptischen 5' Spleißstelle im ersten Exon neben dem korrekt gespleißten auch ein alternativ zu dieser kryptischen 5' Spleißstelle gespleißtes mRNA Produkt entsteht. Deshalb lag es nahe zu untersuchen, ob dieses alternative Spleißprodukt auch in vivo gemacht wird. Aus diesem Grund wurde aus einem haploiden α - bzw. α -Stamm (DH484, KN79) und aus einem diploiden α/α -Stamm (KN79 $\times$ II1A) Gesamt-RNA isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde Poly(A)+RNA angereichert und 2 μ g davon für reverse Transkriptionsanalysen mit dem 5'-[³²P]-markierten Oligodeoxynukleotid E2 als Primer verwendet. Wie bei den in vitro Analysen diente ddGTP als spezifisches Stopnukleotid und ermöglichte auf diese Weise die Identifizierung verschiedener Spleißprodukte. In Abb. 18 sind die Ergebnisse der reversen Transkriptionen gezeigt. Im Ansatz mit Poly(A)+RNA aus *MAT α* Hefezellen (α) konnten keine *MATa1* spezifischen cDNA Transkripte (31, 37 oder 45 Nukleotide) auftreten, da in *MAT α* Zellen das *MATa1* Gen nicht exprimiert wird. Deshalb waren alle hier zu erkennenden Signale auf

Kreuzhybridisierungen des Oligodeoxynukleotids E2 mit anderen RNAs zurückzuführen. Einzelheiten dazu finden sich im Anhang dieser Arbeit.

Verwendete man Poly(A)+RNA aus haploiden *MATa* (a), bzw. diploiden *MATa/α* Zellen (a/α) für die reverse Transkriptionsanalyse, so waren neben den oben beschriebenen unspezifischen cDNA Transkripten große Mengen an cDNAs von 37 Nukleotiden Länge zu erkennen. Dies deutete darauf hin, daß der Großteil der *MATa1* RNA in der Zelle als korrekt gespleißte mRNA vorliegt. Dies trifft zumindest für das erste Intron des *MATa1* Gens zu. Eindeutig zu erkennen war außerdem das 45 Nukleotide lange cDNA Transkript, das durch reverse Transkription der alternativ gespleißten *MATa1* mRNA entsteht.

Es konnte somit gezeigt werden, daß ein zu der kryptischen 5' Spleißstelle gespleißtes alternatives *MATa1* mRNA Produkt nicht nur in vitro, sondern auch in vivo in haploiden a- und diploiden a/α-Zellen auftritt.

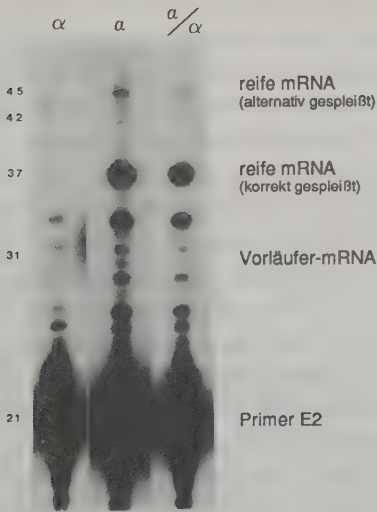


Abb. 18: Nachweis verschiedener *MATa1* mRNAs durch reverse Transkription
Je 2 µg Poly(A)+RNA aus α, a und a/α Hefezellen wurden in Gegenwart von ddGTP mit dem 5'-[32P]-markierten Oligodeoxynukleotid E2 als Primer revers transkribiert. Neben den nicht-*MATa1*-spezifischen cDNA Transkripten (α) sind hauptsächlich 37 und 45 Nukleotide lange cDNA Transkripte zu erkennen (a und a/α). Das 37 Nukleotide lange cDNA Transkript entsteht aufgrund einer mRNA mit korrekt gespleißtem ersten Intron. Das 45 Nukleotide lange cDNA Transkript resultiert aus einer alternativ zur kryptischen 5' Spleißstelle gespleißten mRNA.

3.2.1.2 Nachweis einer *MATa1* mRNA, die durch "exon-skipping" entsteht

Eine andere alternative Spleißreaktion, die nur bei primären Transkripten mit mehr als einem Intron auftreten kann, ist das sog. "exon-skipping". Beim "exon-skipping" wird das zwischen zwei intervenierenden Sequenzen liegende Exon zusammen mit den flankierenden Intronsequenzen aus dem Vorläufermolekül entfernt. Für das primäre *MATa1* Transkript würde dies bedeuten, daß das gesamte zweite Exon zusammen mit den flankierenden Introns

als ein großes Intron aus der Vorläufer-mRNA entfernt wird. Das Ergebnis wäre ein alternatives Spleißprodukt, bei dem Exon I mit Exon III verknüpft wäre.

Reverse Transkriptionsanalysen mit dem 5'-[³²P]-markierten Oligodeoxynukleotid E3, in Gegenwart von ddCTP sollten zeigen, ob ein solches alternatives Spleißprodukt in vitro oder in vivo entsteht. Wie in Abb. 19 zu sehen ist, hybridisiert das Oligodeoxynukleotid E3 an Exon III Sequenzen nahe dem zweiten Intron. Wird die reverse Transkription in Gegenwart von ddCTP durchgeführt, so ergeben sich für Vorläufer-mRNAs und für mRNAs mit korrekt gespleißtem zweiten Intron cDNA Transkripte von 24 Nukleotiden Länge. Im Falle eines alternativen Spleißproduktes das durch "exon-skipping" entstanden ist, sollte die reverse Transkription ein 56 Nukleotide langes cDNA Transkript liefern.

Analysen dieser Art wurden mit Poly(A)⁺RNA aus haploiden α -Zellen (DH484) und als Kontrolle α -Zellen (KN79), sowie mit einer in vitro synthetisierten und in einem α -Spleißextrakt inkubierten *MATa1* Vorläufer-mRNA (DNA-Matrize für die in vitro Transkription: pBEMAT/WT x BstNI) durchgeführt. Abb. 19 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen. Die Analyse in vitro gespleißter Vorläufer-mRNA ergab große Mengen an 24 Nukleotide langen cDNA Transkripten. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die große Menge an ungespleißter Vorläufer-mRNA im in vitro Spleißansatz zurückzuführen, obwohl natürlich aufgrund dieses 24 Nukleotide langen cDNA Transkriptes keine eindeutige Aussage darüber möglich ist, ob es sich um Vorläufer-mRNA oder normal prozessierte mRNA handelt. Sowohl bei der Analyse von in vitro gespleißter RNA, als auch von Poly(A)⁺RNA aus *MATa* Zellen tauchte jedoch darüberhinaus ein 56 Nukleotide langes cDNA Transkript auf, das auf die Existenz des oben erwähnten alternativen Spleißproduktes hinwies. Bestärkt wurde diese Annahme dadurch, daß dieses cDNA Transkript nur in Poly(A)⁺RNA aus *MATa* und nicht in Poly(A)⁺RNA aus *MAT α* Zellen zu finden war. Das sehr stark aufleuchtende cDNA Transkript von etwa 36 Nukleotiden Länge, das bei der Analyse von Poly(A)⁺RNA aus *MAT α* Zellen auftaucht, ist kein *MATa1* spezifisches cDNA Transkript, wie Untersuchungen dazu, die im Anhang dieser Arbeit beschrieben sind, verdeutlichen.

Das 56 Nukleotide lange *MATa* spezifische cDNA Transkript belegt somit eindeutig die Existenz eines alternativen Spleißproduktes, das durch "exon-skipping" sowohl in vitro, als auch in vivo entsteht.

3.2.2 Analyse chromosomaler *MATa1* Mutanten

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß es sowohl in vitro, als auch in vivo alternative *MATa1* mRNA Spleißprodukte gibt, stellte sich die Frage, inwieweit diese alternativen Spleißprodukte eine biologische Funktion besitzen.

Um dieser Frage nachzugehen wurden chromosomale *MATa1* Hefemutanten erzeugt, die nicht mehr in der Lage sind diese alternativen Spleißprodukte zu generieren. Phänotypische Untersuchungen sollten dann zeigen, welche Auswirkungen diese Mutationen haben.

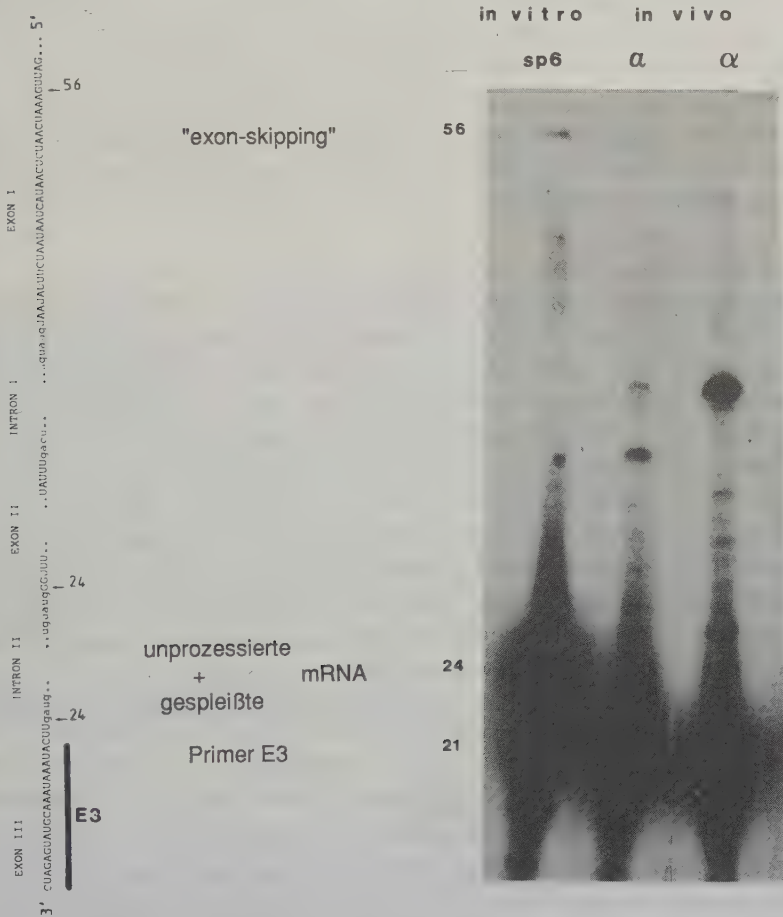


Abb. 19: Reverse Transkriptionsanalysen von Poly(A)+RNA und in vitro prozessierter *MATa1* Vorläufer-mRNA

2 µg Poly(A)+RNA aus *MATa* und *MATα* Hefezellen sowie in vitro prozessierte *MATa1* Vorläufer-mRNA (aus pBEMAT/WT x BstNI) die beide Introns enthielt wurden durch reverse Transkription in Gegenwart von ddCTP mit dem 5'-[³²P]-markierten Primer E3 analysiert. Der Primer E3 hybridisiert an *MATa1* Exon 3-Sequenzen und die reverse Transkription erfolgt in Richtung 5' Ende der mRNA. RNA Moleküle mit und ohne gespleißtem zweiten Intron führen bei reverser Transkription zu cDNA Transkripten von 24 Nukleotiden Länge. Für den Fall eines alternativen Spleißprodukts, das durch "exon-skipping" entstanden ist, entsteht bei reverser Transkription ein cDNA Transkript von 56 Nukleotiden Länge.

3.2.2.1 Erzeugung chromosomaler *MATa1* Hefemutanten

Insgesamt wurden fünf chromosomale *MATa1* Hefemutanten erzeugt. Die S-Mutante (KN79*/S) trug anstelle des Stopkodons im ersten Intron (UGA) das für Glycin kodierende Kodon (GGA). Außerdem war das 5' davon liegende Kodon (UUU), das für Leucin kodiert, zu einem für Prolin kodierenden Kodon (CCG) verändert. Bei den Mutanten KN79*/DIVS1, KN79*/DIVS2 und KN79*/DIVS1,2 waren entweder eine oder beide Intronsequenzen am *MATa1* Locus exakt deletiert worden. Die SUP6-Mutante (KN79*/R) trug ein durch das Suppressor tRNA Gen (SUP6) disruptiertes *MATa1* Gen. Bis auf die erwähnten Mutationen wiesen die *MATa1* Hefemutanten keine weiteren Veränderungen auf. Es handelte sich somit um ansonsten isogene Hefestämme.

In vitro Mutagenese des *MATa1* Gens

Ausgangspunkt für die in vitro Mutageneseexperimente war das M13-*MATa1* Konstrukt pMAT13/WT. Dieses Plasmid enthielt den gesamten kodierenden Bereich des *MATa1* Gens und einen Teil dessen flankierender Sequenzen (vgl. Abb. 4). Zwei *MATa1* in vitro Mutationen, die nukleotidgenaue Deletion des ersten Introns (Δ IVS1-Mutante) und die Veränderung des Stopkodons im ersten Intron (Sma-Mutante), wurden bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben (pMAT13/S und pMAT13/ Δ IVS1). Genau auf die gleiche Weise wurde die *MATa1* Mutante erzeugt, bei der das zweite Intron deletiert war. Für diese in vitro Mutagenese wurde das Mutagenese-Oligodeoxynukleotid E2-3 (5'-CGTTTATTTATGAA-CCAAACTC-3') verwendet. Die Doppelmutante pMAT13/ Δ IVS1,2, bei der beide intervenierende Sequenzen deletiert sind, wurden durch zwei aufeinanderfolgende Mutagenesen erzeugt. Alle Mutanten wurden durch Plaquehybridisierungen identifiziert und durch Sequenzierung des entsprechenden DNA-Einzelstranges, bzw. nach erfolgter Subklonierung in pUC13 oder pSP64 Vektoren, durch Plasmiddoppelstrang-Sequenzierung bestätigt (vgl. Abb. 5).

Subklonierung der *MATa1* Mutanten in pUC13

Für die geplanten in vivo Experimente sollten die mutagenisierten *MATa1* Konstrukte am chromosomalen *MATa* Locus eingebaut werden, ohne direkt flankierende Sequenzen zu verändern. Deshalb wurden zuerst die durch in vitro Mutagenese veränderten *MATa1* Sequenzen in das 4.2 Kbp große genomische HindIII Fragment zurückkloniert. Durch Verwendung dieser HindIII Fragmente für einen "Gen-Austausch", blieben die flankierenden Sequenzen des *MATa1* Gens unverändert. Der *MATa* Locus der Hefemutanten entsprach somit bis auf die Mutationen im *MATa1* Gen selbst völlig der Wildtyp-Konfiguration. Die Subklonierung der *MATa1* Mutanten in pMAT/WT (siehe Abb. 3) erfolgte über einen Partialverdau des Plasmids. pMAT/WT wurde mit BglII komplett am 3' Ende des *MATa1* Gens linearisiert und anschließend mit XbaI partiell gespalten (10 μ g linearisierte Vektor-

DNA wurde mit 0.1 U XbaI 10 Min bei 37 °C in einem Volumen von 50 µl gespalten). Auf einem 0.8 % Agarosegel wurde der Spaltansatz 16 Std bei 30 V / 20 cm aufgetrennt und das um etwa 1 Kbp verkleinerte linearisierte Plasmid aus dem Gel eluiert. Parallel dazu wurden BglII-XbaI Fragmente aus pMAT13/S, pMAT13/ΔIVS1, pMAT13/ΔIVS2 und pMAT13/ΔIVS1,2, die die mutagenisierten *MATa1* Regionen enthielten, eluiert und mit dem partiell geschnittenen, geleluierten Vektor verknüpft. Transformationskompetente *E. coli* JM109 Zellen wurden damit transformiert und rekombinante Klone durch Sequenzanalyse untersucht. Mit geeigneten Sequenzierprimern, die spezifisch im ersten, bzw. dritten Exon des *MATa1* Gens hybridisieren (E2, E3), konnten die *MATa1* Mutationen (pMAT/S, pMAT/ΔIVS1 pMAT/ΔIVS2, pMAT/ΔIVS1,2) nochmals durch DNA-Sequenzierung bestätigt werden (nicht gezeigt), bevor sie für Hefetransformationsexperimente benutzt wurden.

Insertion einer Suppressor tRNA in das *MATa1* Gen

Als Suppressor wurde das *SUP6* Gen, das eine "ochre"-Kodons supprimierende tRNA^{Tyr} enthält ausgewählt (Wallace et al., 1980; Johnson und Abelson, 1983). Ein geleluiertes 750 bp langes BamHI Fragment, welches das gesamte tRNA Gen enthielt wurde in die einzige BglII Schnittstelle von pMAT/WT inseriert und rekombinante Klone durch Restriktionsanalysen charakterisiert. Abb. 20B zeigt die Restriktionskarte eines der analysierten Klone (pMAT/R), die das *SUP6* Gen enthielten. Durch weitere Restriktionsspaltungen mit HindII/SmaI (Abb. 20A) konnte auch die Orientierung des *SUP6* Gens ermittelt werden. Das Auftreten eines ca. 2 Kbp großen HindII-SmaI Fragments bestätigte die in der Abb. 20B angegebene Orientierung des inserierten BamHI Restriktionsfragments.

Erzeugung chromosomalen *MATa1* Mutanten

Die Erzeugung chromosomaler *MATa1* Hefemutanten sollte zunächst über eine Kotransformation der mutagenisierten *MATa1* Fragmente zusammen mit einem selektierbaren 2µ Plasmid versucht werden. Abb. 21 zeigt schematisch den Gang des Experimentes. *MATα* Hefezellen (KN79) sollten mit YEp13-DNA (LEU2⁺) und einem 4.2 Kbp HindIII *MATa1* Fragment transformiert werden. Auf LEU⁻-Platten sollte auf LEU2⁺-Transformanden selektioniert, und die Transformanden dann mit einem *MATα* Testerstamm (III C) konjugiert werden. Daran sollte sich eine Selektion auf synthetischem Minimalmedium auf prototrophe diploide Hefezellen anschließen. Bei LEU2⁺-Transformanden, die mit *MATα* Testerzellen konjugieren können, sollte deshalb ein Genaustausch am *MAT* Locus erfolgt sein. Die diploiden Zellen sollten dann Sporulationsbedingungen unterworfen werden, so daß sie Tetraden bilden konnten, die dann durch Tetraden- und Southernblotanalysen auf die *MATa1* Mutationen hin untersucht werden konnten.

A

1 2 3 4 5



B

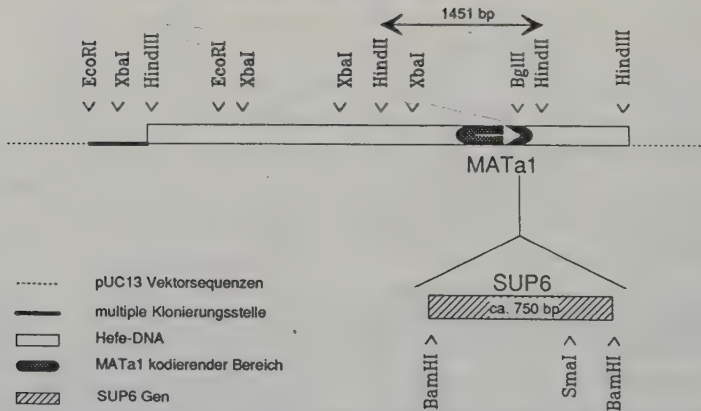


Abb. 20: Restriktionsanalyse (A) und schematische Restriktionskarte (B) des Plasmids pMAT/R

A: Bei den Restriktionsspaltungen wurde jeweils 1 µg Plasmid-DNA mit den unten angegebenen Enzymen gespalten und auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Das Auftreten eines ca. 2000 bp großen HindII-SmaI Fragments (Spur 5), welches durch Insertion des 750 bp SUP6 BamHI Fragments in die singuläre BglII Schnittstelle entstanden ist, läßt nur die hier angegebene Orientierung des Fragments zu (B).

Spur 1: λIII-Längenstandard

Spur 4: pMAT/WT x HindII/SmaI

Spur 2: pMAT/WT x BglII

Spur 5: pMAT/R x HindII/SmaI

Spur 3: pMAT/R x BglII

Entsprechend dem eben beschriebenen Schema wurde der Stamm KN79 mit 10 µg isoliertem HindIII Fragment (aus pMAT/WT, pMAT/S, pMAT/ΔIVS1, pMAT/ΔIVS2, pMAT/ΔIVS1,2

und pMAT(R), zusammen mit 0.5 µg YEp13-DNA mittels der Sphäroplastenmethode transformiert. Außerdem wurde parallel dazu als Kontrolle 0.5 µg YEp13-DNA bzw. nur Wasser für die Transformation verwendet.

Die Transformationsrate betrug ca. $1 \cdot 10^3$ Transformanden/µg DNA. Von jeder Transformation, bis auf die beiden Kontrolltransformationen mit H₂O bzw. YEp13-DNA, wurden je 200 LEU2⁺-Transformanden mit H1C Testerzellen (*MATα*) konjugiert. Nach etwa 12 Std wurden die Konjugationsansätze auf synthetisches Minimalmedium überstempelt und auf prototrophe diploide Hefezellen selektioniert. Wie oben schon erwähnt, zeigte das Auftreten diploider Hefezellen einen Austausch am *MAT* Locus von *MATα* zu *MATa* an. 1 - 4 % der LEU2⁺-Transformanden verhielten sich bei diesem Konjugationstest wie *a*-Zellen.

Der Nachweis, daß es sich bei diesen LEU2⁺, *MATa* Hefezellen auch wirklich um die gesuchten *MATa1* Mutanten handelte, und daß die isolierten *MATa* Hefezellen nicht durch einen unerlaubten, jedoch möglichen Zelltypwechsel von *α* nach *a* entstanden sind, wurde durch Southernblotanalysen geführt. Aus den haploiden *MATa*, LEU2⁺-Transformanden wurde genomische DNA isoliert, mit HindIII gespalten, auf Agarosegelen elektrophoretisch getrennt, geblottet und nacheinander mit den Mutagenese-Oligodeoxynukleotiden MS, E1-2 und E2-3 hybridisiert (nicht gezeigt). Aus diesen Hybridisierungen, sowie aus den in Kapitel 3.2.2.5 beschriebenen Tetradenanalysen und in Abb. 23 gezeigten Southernblotanalysen geht eindeutig hervor, daß alle untersuchten Stämme die gewünschten Mutationen beinhalten und, daß die Mutationen sich auch am *MATa* Locus selbst und nicht an den transkriptions-inaktiven *HML* bzw. *HMR* Loci befanden.

Die Existenz und Lebensfähigkeit dieser haploiden Stämme mit den Mutationen am chromosomalen *MATa1* Locus zeigte somit auch eindeutig, daß die beiden Intronsequenzen im *MATa1* Gen für das vegetative Wachstum nicht essentiell sind.

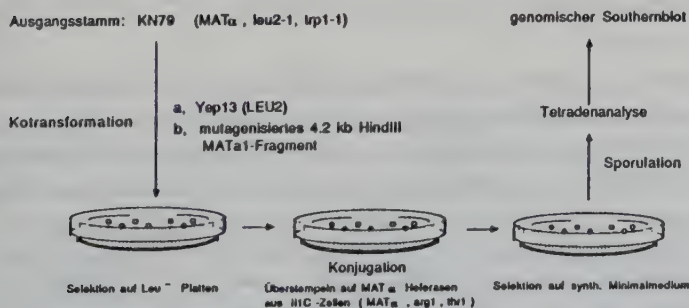


Abb. 21: Schematischer Ablauf eines Experiments zur Erzeugung von Hefestämmen mit Mutationen im chromosomalen *MATa1* Locus. Nähere Einzelheiten dazu finden sich im Text.

3.2.2.2 Analyse der *MATa1* RNA aus den verschiedenen Mutanten

Durch die Analyse der *MATa1* mRNA der verschiedenen Mutanten mittels reverser Transkription, sollte versucht werden, die in vivo Spleißeffizienz des ersten und zweiten Introns zu ermitteln. Dazu wurde aus den Stämmen KN79 [α], KN79* [a], KN79*/S [a], KN79*/ Δ IVS1 [a], KN79*/ Δ IVS2 [a] und KN79*/ Δ IVS1,2 [a] Gesamt-RNA isoliert und jeweils 50 μ g für die Spleißanalyse des ersten und zweiten Introns verwendet. Für die reversen Transkriptionen, die in Gegenwart von ddGTP durchgeführt wurden, wurden die 5'-[³²P]-markierten Oligodeoxynukleotide E2 (für Intron 1) und E3 (für Intron 2) verwendet.

Das Ergebnis der reversen Transkription mit dem Oligodeoxynukleotide E2 und E3 als Primer ist in Abb. 22A und 22B gezeigt. Die Analysen des Kontrollansatzes mit RNA aus *MAT α* Hefezellen (KN79 α) lieferten mehrere *MATa1* unspezifische cDNA Signale, die wahrscheinlich aufgrund von Kreuzhybridisierungen der Oligodeoxynukleotide E2 und E3 entstehen (Abb. 22A, KN79 α ; Abb. 22B, KN79 α). Diese unspezifischen cDNAs besaßen bei der Analyse des ersten Introns eine Länge von 27, 31 und 33 Nukleotiden und bei der Analyse des zweiten Introns eine Länge von 33, 42 und mehr als 50 Nukleotiden.

Durch das Auftreten dieser unspezifischen cDNAs, die zum Teil genauso lang waren wie die spezifischen cDNAs von unprozessierter *MATa1* RNA (31 Nukleotide beim ersten Intron und 33 Nukleotide beim zweiten Intron), war eine quantitative Erfassung der Spleißeffizienz des ersten bzw. zweiten Introns nicht möglich.

Aufgrund der reversen Transkriptionsanalyse mit dem Oligodeoxynukleotid E2 (Abb. 22A), konnte jedoch die Existenz der alternativ zu der kryptischen 5' Spleißstelle im ersten Exon prozessierten *MATa1* mRNA nochmals bestätigt werden, da das Auftreten dieser alternativen *MATa1* mRNA (45 Nukleotide lange cDNA), von der Existenz des ersten Introns abhängt. Diejenigen *MATa1* Mutanten, die kein erstes Intron, aber die kryptische 5' Spleißstelle besaßen (KN79*/ Δ 1 und KN79*/ Δ 1,2), waren auch nicht in der Lage, das alternative mRNA Spleißprodukt zu erzeugen.

Somit konnte durch die Analyse der *MATa1* spezifischen RNA der chromosomalen Hefemutanten zwar nicht die Spleißeffizienz des ersten und zweiten Introns ermittelt werden, doch konnte durch das Fehlen des 45 Nukleotide langen cDNA Transkripts bei den Mutanten ohne erstes Intron (KN79*/ Δ 1 und KN79*/ Δ 1,2) ein weiterer Beweis für die Existenz der alternativ prozessierten *MATa1* mRNA in vivo erbracht werden.

3.2.2.3 Untersuchungen zur Konjugation

Der Nachweis, daß alle *MATa1* Mutanten in der Lage sind mit *MAT α* Zellen zu konjugieren, wurde im Prinzip schon bei der Erzeugung der Mutanten geführt, bei der die Fähigkeit zur

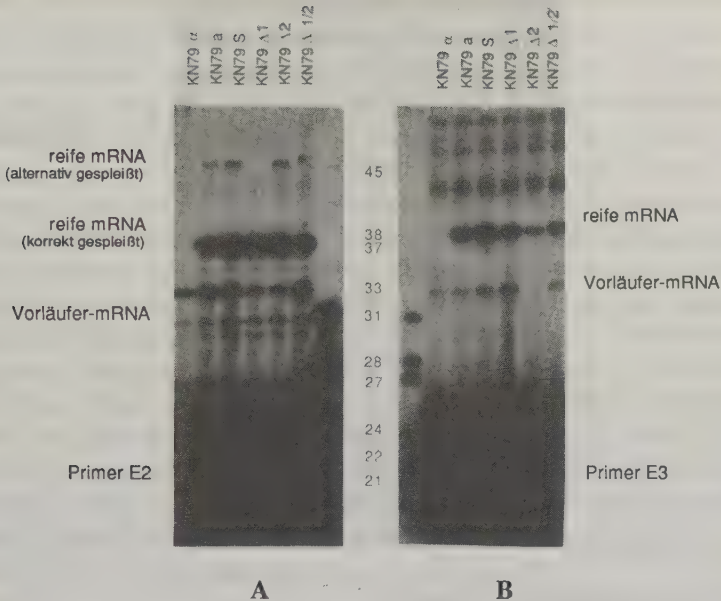


Abb. 22: Analyse der *MATa1* spezifischen mRNA der Hefestämme mit den am *MATa* Locus eingeführten Mutationen

Je 50 µg Gesamt-RNA aus den Hefestämmen KN79 [α], KN79* [a], KN79*/S [a], KN79*/ΔIVS1 [a], KN79*/ΔIVS2 [a] und KN79*/ΔIVS1,2 [a] wurden in Gegenwart von ddGTP mit den 5'-[³²P]-markierten Oligodeoxynukleotiden E2 (A) bzw. E3 (B) als Primer revers transkribiert. Neben den nicht *MATa1*-spezifischen cDNA Transkripten (siehe KN79 [α]) treten in (A) hauptsächlich 37 und 45 Nukleotide lange cDNA Transkripte auf, die von mRNA Molekülen mit korrekt und alternativ gespleißtem ersten Intron stammen. Bei der Analyse des zweiten Introns (B) tritt vor allem ein 38 Nukleotide langes cDNA Transkript auf, das aufgrund von mRNAs entsteht, deren zweites Intron korrekt entfernt ist. Ein Vorläufer-mRNA Molekül mit unprozessiertem zweiten Intron erzeugt ein cDNA Transkript von 33 Nukleotiden Länge.

Konjugation ein wesentliches Selektionsmerkmal war. Dies bedeutete jedoch nur, daß die Intronsequenzen im *MATa1* Gen für das Konjugationsereignis an sich nicht unbedingt erforderlich sind. Sie konnten jedoch trotzdem eine modulierende Rolle spielen. Ob dies der Fall war, sollte in einem quantitativ erfaßbaren Konjugationsexperiment der Mutanten mit verschiedenen Testerstämmen ermittelt werden.

Dazu wurden je $5 \cdot 10^6$ Testerzellen (II1A, II1C) mit je $5 \cdot 10^6$ Zellen der verschiedenen *MATa1* Mutanten (KN79*/S, KN79*/ΔIVS1, KN79*/ΔIVS2, KN79*/ΔIVS1,2, KN79*/R) als auch zweier Kontrollen (KN79 und KN79*) in 1 ml YPD-Vollmedium in 10 ml Plastikröhrchen gemischt und 12 Std bei 30 °C stengelassen. Zur Bestimmung der Konjugationsrate wurden am nächsten Tag verschiedene Verdünnungen auf synthetischem Minimalmedium- und YPD-Platten ausplattiert und die Konjugationsraten berechnet.

Alle *MATa1* Mutanten zeigten mit dem komplementären Zelltyp normale Konjugationsraten von etwa 10 - 20 %. Erzwungene Konjugationen mit dem gleichen Zelltyp führten zu Konjugationsraten von etwa 0.001 - 0.0002 %, wie sie auch in der Literatur beschrieben sind. Der *MAT α* Kontrollstamm KN79 verhielt sich erwartungsgemäß genau umgekehrt wie die *MATa* Stämme. Er zeigte Konjugationsraten von ca. 20 % mit dem *MATa* Testerstamm und etwa 0.002 % mit dem *MAT α* Testerstamm. Überraschend war jedoch das Konjugationsverhalten des Wildtyp *MATa* Stammes (KN79*). Er verhielt sich weder wie ein *MATa* noch wie ein *MAT α* Stamm. Mit *MATa* Testierzellen ergaben sich Konjugationsraten von 0.07 % und mit *MAT α* Testierzellen von etwa 0.002 %. Untersuchungen zu diesem Phänomen sind zur Zeit innerhalb einer Kooperation mit Dr. Michael Breitenbach (Universität Wien) im Gange, haben jedoch bis jetzt zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt. Obwohl dieses Kontrollexperiment mit dem isogenen *MATa* Stamm noch nicht zu interpretieren ist, scheinen die Intronsequenzen des *MATa1* Gens keinen Einfluß auf die Konjugationsrate zu haben, da die Konjugationsraten aller Intronmutanten mit den in der Fachliteratur beschriebenen Werten übereinstimmen (MacKay und Manney, 1974a; MacKay und Manney, 1974b; Hicks und Herskowitz, 1977).

3.2.2.4 Untersuchungen zur Sporulation

Die Sporulation ist eine Phase im Lebenszyklus der Hefe, bei der das *MATa1* Gen nachweislich zumindest eine indirekte Rolle spielt, da die Inaktivierung des *MATa1* Gens zu einem sporulationsnegativen Phänotyp führt (Nasmyth et al., 1981b). Deshalb lag es nahe, die *MATa1* Mutanten auf ihren Sporulationsphänotyp hin zu untersuchen. In einem quantitativen Sporulationsexperiment sollte geprüft werden, ob die diploiden *MATa1* Mutanten ($\text{KN79}^*/\text{S} \times \text{II1C}$, $\text{KN79}^*/\text{R} \times \text{II1C}$, $\text{KN79}^*/\Delta\text{IVS1} \times \text{II1C}$, $\text{KN79}^*/\Delta\text{IVS2} \times \text{II1C}$, $\text{KN79}^*/\Delta\text{IVS1,2} \times \text{II1C}$) unterschiedliche Sporulationseffizienzen besitzen.

Dazu wurden je $5 \cdot 10^6$ diploide Hefezellen der *MATa1* Mutanten, ebenso wie die *MATa1* Wildtyp Kontrolle ($\text{KN79}^* \times \text{II1C}$), Sporulationsbedingungen unterworfen (Inkubation in 1 % K-Acetat, 30 °C, 72 Std), und anschließend unter dem Mikroskop in einer Thomakammer das Auftreten von Tetraden quantitativ erfaßt.

Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Breitenbach (Universität Wien) durchgeführt. Sie ergaben, daß die Sporulationseffizienzen der *MATa1* Mutanten sich nur unwesentlich von der *MATa1* Wildtyp Kontrolle unterschieden. Einzige Ausnahme war der "Rezeptorstamm" $\text{KN79}^*/\text{R}$, der auch bei veränderten Sporulationsbedingungen (Temperatur, Medium, Inkubationszeit) absolut keine Sporen bilden konnte. Daraus läßt sich schließen, daß durch die Insertion des *SUP6* tRNA Gens, das *MATa1* Gen inaktiviert worden ist und die Mutante deshalb den sporulationsnegativen Phänotyp (spo^-) zeigt.

Diese Untersuchungen demonstrieren somit, daß die Intronsequenzen im *MATa1* Gen für die Sporulation nicht essentiell sind.

3.2.2.5 Untersuchungen zur Germination

Quantitative Konjugations- und Sporulationsexperimente hatten gezeigt, daß die *MATa1* Intron Mutanten sowohl auf Konjugation als auch auf Sporulation keinen messbaren Einfluß hatten, und daß alle *MATa1* Intron Mutanten in der Lage waren Tetraden zu bilden. Im folgenden sollte nun untersucht werden, ob auch alle vier gebildeten Sporen lebensfähig waren und auskeimen konnten.

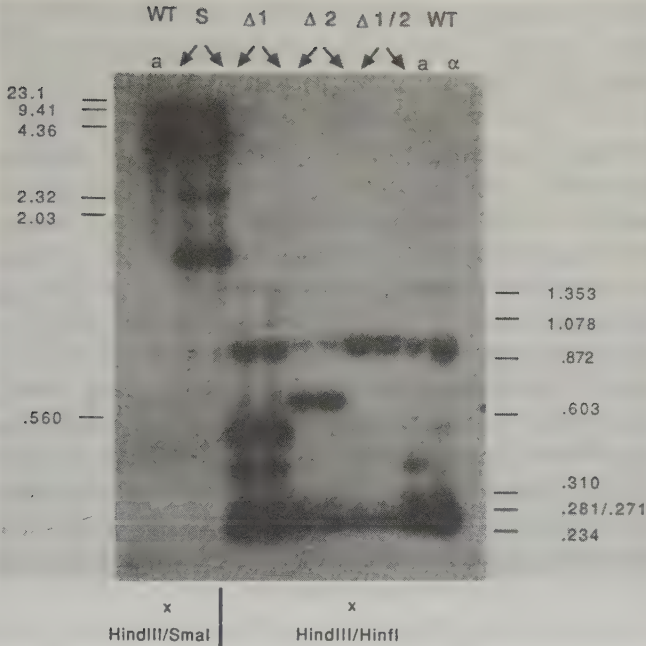
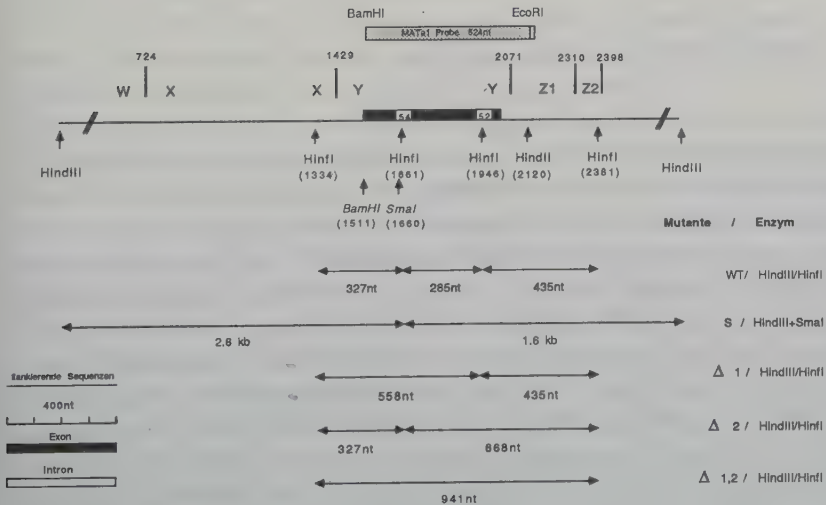
Deshalb wurden die haploiden *MATa1* Mutanten (KN79^{*}/S, KN79^{*}/ΔIVS1, KN79^{*}/ΔIVS2, KN79^{*}/ΔIVS1,2) als auch der Wildtypstamm KN79^{*} mit dem *MATα* Stamm IIIc konjugiert und die daraus resultierenden diploiden Stämme Sporulationsbedingungen unterworfen. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden von jedem diploiden Stamm aus mehreren Tetraden die vier Sporen isoliert und ihr Wachstumsverhalten auf Vollmediumplatten beobachtet. Alle 4 Mutanten zeigten im Vergleich zur Wildtypkontrolle keinerlei Unterschiede. Die vier Sporen waren lebensfähig und bildeten gleich große Kolonien.

Durch Kreuzungen der vier Sporen mit *MATa* und *MATα* Testerstämmen wurden die zwei *MATa* Sporen identifiziert und genomische DNA aus den haploiden Sporen isoliert. Abb. 23A zeigt einen genomischen Southernblot von HindIII/HinfI bzw. HindIII/SmaI-verdauter genomischer DNA haploider Tochterzellen, für dessen Hybridisierung ein nach der "random hexamer labeling"-Methode hergestelltes [³²P]-markiertes *MATa1* spezifisches Fragment (624 bp EcoRI-BamHI Fragment aus pBEMAT/WT) benutzt wurde. Wie aus Abb. 23B zu erkennen ist, hybridisieren bei allen Mutanten die für sie charakteristischen Restriktionsfragmente. So treten zum Beispiel bei der Sma-Mutante aufgrund der SmaI-Restriktionsschnittstelle im ersten Intron, zwei sehr große (1.6 und 2.6 Kbp) HindIII-SmaI Fragmente auf. Bei der ΔIVS1-Mutante ist die HinfI-Restriktionsschnittstelle im ersten Intron bei Position 1661 deletiert, so daß ein 558 bp großes mit *MATa1*-DNA hybridisierendes HinfI Fragment entstehen muß. Bei der ΔIVS2-Mutante ist die HinfI Stelle bei Position 1946 deletiert, wodurch ein neues 668 bp langes HinfI Restriktionsfragment entstehen sollte, was auch durch die Hybridisierung bestätigt wurde. Die Doppelmutante ΔIVS1,2 hat beide HinfI Stellen bei Position 1646 und 1964 verloren, so daß ein noch größeres, d. h. 941 bp langes *MATa1* spezifisches HinfI Fragment mit der radioaktiv markierten Probe hybridisiert. Überlagert sind diese für den *MATa* Locus spezifischen Hybridisierungen durch die Hybridisierung der Probe mit *MATa* Fragmenten im *HML* bzw. *HMR* Locus. Je nachdem, ob sich die "stumme" Kopie des *MATa1* Gens am *HML* oder *HMR* Locus befindet, ergeben sich unterschiedliche Hybridisierungsmuster (vgl. WT α und α in Abb. 23A).

Dieses Experiment läßt somit einerseits erkennen, daß die *MATa1* Mutationen nur den *MAT* Locus und nicht den *HML* bzw. *HMR* Locus betrafen und andererseits, daß die Mutationen korrekt an die beiden *MATa* Tochterzellen vererbt worden sind. Damit zeigen diese Untersuchungen weiterhin, daß die Intronsequenzen des *MATa1* Gens auch für die Germination nicht essentiell sind.

Abb. 23: Genomische Southernblot-Analyse der chromosomalen *MATa1* Mutanten

Die Tetradenanalysen der chromosomalen *MATa1* Mutanten lieferten 4 haploide Sporen. Aus den ausgekeimten *MATa* spezifischen Sporen wurde genomische DNA isoliert, mit Restriktionsenzymen gespalten und durch Southernblot-Analysen untersucht (A): Je 10 µg genomische DNA wurden mit *HindIII* und *SmaI* bzw. *HindIII* und *HinfI* gespalten; S: KN79^{*}/S x IIIC, Δ1: KN79^{*}/ΔIVS1 x IIIC, Δ2: KN79^{*}/ΔIVS2 x IIIC, Δ1,2: KN79^{*}/ΔIVS1,2 x IIIC, WT: KN79^{*}/WT x IIIC. Als Kontrolle wurde auch genomische DNA aus einer ausgekeimten *MATα* Spore des Wildtyps (WT, α) isoliert und auf die gleiche Weise analysiert. Als radioaktive Probe wurde das 624 bp große *Bam*HI-*Eco*RI Fragment aus pBEMAT/WT verwendet. Die durch diese Probe erfaßten *MATa1* spezifischen Restriktionsfragmente sind in B wiedergegeben. Die Positionen der Restriktionsschnittstellen sind der Arbeit von Astell et al. (1981) entnommen.

A**B**

4. DISKUSSION

4.1 In vitro und in vivo Spleißuntersuchungen am *MATa1* Gen

Die Untersuchungen zum Spleißmechanismus von mRNA-Vorläufern konzentrierten sich in den letzten Jahren vor allem auf die Beteiligung der dabei in trans agierenden Faktoren und deren Charakterisierung. Die Verfügbarkeit temperatursensitiver RNA-Spleißmutanten (11 Komplementationgruppen: *rna1* - *rna11*; Hartwell, 1967; Hartwell et al., 1970) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* war eine ausgezeichnete Basis für die Identifizierung von essentiellen, am Spleißprozeß beteiligten Faktoren.

Die Etablierung eines *Saccharomyces cerevisiae* in vitro Spleißsystems (Lin et al., 1985) lieferte zum einen ein Testsystem für die traditionelle biochemische Isolierung der am Spleißprozeß beteiligten Faktoren, zum anderen gestattete es, in cis wirkende und für den Spleißprozeß essentielle Elemente der Vorläufer-mRNAs genau zu analysieren. Besonders die konservierten Intronsequenzen am 5' Ende (GTATGT), 3' Ende (PyAG) und in der internen Erkennungsregion (TACTAAC) des Introns wurden durch in vitro Mutagenese verändert und durch in vitro Spleißanalysen deren Auswirkungen auf die Spleißreaktion untersucht (Newman et al., 1985; Parker und Guthrie, 1985; Rymond und Rosbash, 1985; Fouser und Friesen, 1986; Vijayraghavan et al., 1986). Nur sehr wenige Untersuchungen richteten das Augenmerk auf die nicht-konservierten Regionen der Intronsequenz (Pikielny und Rosbash, 1985; Fouser und Friesen, 1987; Newman, 1987).

4.1.1 Bestimmung der Minimallänge eines Introns

Durch die schrittweise Verkürzung des Abstandes zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt wurde für das erste Intron im *MATa1* Gen eine Minimaldistanz von 42 Nukleotiden zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt ermittelt, die für ein korrektes und effizientes Herausschneiden dieses Introns in vitro notwendig ist. Eine Reduktion dieses Abstandes um ein Nukleotid auf 41 Nukleotide führte bereits zu einer Verringerung der Spleißeffizienz um 60 %. Obwohl in vitro erhaltene Daten nicht in jedem Fall auf die in vivo Situation übertragbar sind, könnte dieses Resultat durchaus eine Erklärung für die in vivo beobachtete reduzierte Spleißeffizienz des zweiten Introns im *MATa1* Gen liefern (Miller, 1984). Der Abstand zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt beträgt nämlich im zweiten Intron 41 Nukleotide und ist somit um ein Nukleotid kürzer als der entsprechende Abstand im ersten Intron. Die reduzierte Spleißeffizienz des zweiten Introns im *MATa1* Gen wurde bisher mit seiner Position im 3' proximalen Bereich des primären *MATa1* Transkripts begründet. Daß die Lage des Introns

im mRNA-Vorläufer die Spleißeffizienz zumindest in vivo beeinflussen kann, wurde durch Experimente von Klinz und Gallwitz (1985) belegt, indem sie zeigen konnten, daß die Spleißeffizienz des Actingenintrons immer mehr abnahm, je weiter die intervenierende Sequenz vom 5' Ende der Prä-mRNA entfernt wurde. Ähnliche Effekte wurden auch in dieser Arbeit bei in vitro Spleißanalysen zur Spleißeffizienz des ersten Introns im *MATa1* Transkript beobachtet: Eine Reduktion der Länge des ersten Exons um 72 Nukleotide und damit eine entsprechende Annäherung des ersten Introns an das 5' Ende der Vorläufer-mRNA erhöhte die in vitro Spleißeffizienz um das ca. 3 - 5fache. Aus den genannten Gründen ist es also möglich, daß sowohl die Position, als auch die Distanz zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt, oder auch beide Faktoren zusammen die geringere Spleißrate des zweiten Introns im *MATa1* Transkript in vivo verursachen.

Die schrittweise Verkürzung des Abstandes zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt im ersten Intron des *MATa1* Gens bedingte nicht nur eine Längenveränderung, sondern damit einhergehend auch einen Verlust von eventuell wichtigen Sequenzmotiven. Deshalb war es auch zunächst nicht zwingend zu folgern, daß die beobachtete verringerte Spleißeffizienz, bzw. die völlige Blockierung der Spleißreaktion, ausschließlich eine Folge der reduzierten Intronlänge war. Aus diesem Grund wurden Sequenzen, die zur deletierten Intronsequenz komplementär waren, wieder inseriert, und somit die Ausgangslänge, jedoch mit veränderter Sequenz, wiederhergestellt. Da diese kompensatorische Mutante keinerlei Auswirkungen auf die Spleißreaktion hatte, konnte geschlossen werden, daß durch die Deletionen im Intron keine wichtigen Sequenzmotive betroffen waren. Für das *CYH2* Gen konnte zwar gezeigt werden, daß zusätzlich zu den bekannten konservierten Intronsequenzen an der 5' Spleißstelle, der internen Verzweigungsregion und der 3' Spleißstelle, weitere Sequenzen zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt für korrektes Spleißen notwendig sind (Newman, 1987), doch scheint dies nur für relativ große intervenierende Sequenzen zu gelten.

Genaue Analysen der Intronsequenz von verschiedenen niederen Eukaryonten (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schizophyllum commune*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*) veranlassten Parker und Patterson (1987), die Introns dieser Spezies in zwei Klassen einzuteilen. Sie unterscheiden zwischen kurzen und langen 5' und 3' Intronsequenzen, wobei mit 5' bzw. 3' Intronsequenzen die Distanzen zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt, beziehungsweise zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle gemeint sind. Für vier dieser langen 5' Intronsequenzen im *CYH2*-, *S10*-, *RP51A*- und *ACT1*-Gen konnte eine mögliche helikale "stem-loop" Struktur ermittelt werden (Parker und Patterson, 1987), die den Abstand 5' Spleißstelle - interner Verzweigungspunkt auf einen Abstand, wie er bei kurzen 5' Intronsequenzen vorliegt (ca. 50 Nukleotide), verkürzt. Auch das *TRP5* Gen liefert ein Indiz dafür, daß es neben den bekannten konservierten Intronsequenzen weitere wichtige Elemente in intervenierenden Sequenzen geben kann. Denn obwohl das *TRP5* Gen eine

Sequenz mit allen für ein 5' langes mRNA Intron charakteristischen Eigenschaften und Erkennungssignale besitzt, wird es nicht gespleißt (Parker, 1985).

Aufgrund dieser Daten sind jedoch nur für lange 5' Intronsequenzen auch zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt notwendige Sequenzen für die Spleißreaktion zu erwarten, die die Aufgabe haben, die 5' Spleißstelle und den internen Verzweigungspunkt so zu positionieren, daß er von der Spleißmaschinerie erfaßt werden kann. Kurze 5' Intronsequenzen bedürfen einer solchen Positionierung sehr wahrscheinlich nicht, da sie ohnehin schon nahe beieinander liegen, bzw. den richtigen Abstand haben. Diese Annahme bestätigen auch die *in vitro* Spleißanalysen der kompensatorischen Mutanten pBEMAT-7C und pBEMAT/S, bei denen insgesamt neun von 31 nicht konservierten Nukleotiden zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt "ausgetauscht" werden konnten, ohne die Spleißeffizienz zu beeinflussen.

Um nun endgültig die Frage beantworten zu können, ob für die ermittelte Minimallänge des ersten *MATa1* Introns die Gesamtlänge oder der Abstand 5' Spleißstelle - interner Verzweigungspunkt entscheidend ist, wurde eine kompensatorische Intronmutante (pBEMAT- Δ 7A) erzeugt, bei der die "TACTAAC-Box" um acht Nukleotide in Richtung 5' Ende verschoben ist, ohne dabei jedoch die Gesamtlänge des Introns zu verändern. Nachdem ein solches Konstrukt *in vitro* nicht gespleißt werden konnte, muß daraus geschlossen werden, daß nicht die Gesamtlänge des Introns, sondern der Abstand zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt eine notwendige Minimaldistanz nicht unterschreiten darf, um ein korrektes Spleißen zu ermöglichen.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, in denen gezeigt wurde, daß auch *in vivo* eine Mindestdistanz zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt notwendig ist (Thompson-Jäger und Domdey, 1987). Diese Untersuchungen, die mit dem Actingen von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt worden sind, zeigen, daß ein Abstand von 44 Nukleotiden zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt ausreicht, während ein Actinkonstrukt mit einem Abstand von 30 Nukleotiden zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt im Intron nicht mehr gespleißt wird.

Aus *in vitro* Spleißanalysen von Rymond und Rosbash (1985) war gefolgert worden, daß für die ersten Schritte der Spleißreaktion, den Schnitt am 5' Ende des Introns und die Bildung des 2/3-Moleküls, nur die 5' Spleißstelle und die interne Erkennungsregion notwendig sind und daß die konservierte 3' Spleißstelle dafür nicht benötigt wird, d. h. daß für die Spleißreaktion in *Saccharomyces cerevisiae* nur die intakte 5' Spleißstelle und die interne Erkennungsregion vorhanden sein müssen. Aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse muß dieser Schluß dahingehend erweitert werden, daß zusätzlich zu diesen beiden konservierten Regionen im Intron auch eine Mindestdistanz zwischen diesen Regionen notwendig ist. In *in vitro* Spleißkomplexanalysen der verkürzten Mutante pRMAT- Δ 7 zeigten nämlich, daß,

obwohl alle notwendigen konservierten Erkennungsregionen im Intron vorhanden waren, keine Spleißkomplexe gebildet werden konnten.

Die Intronsequenzen zwischen der "TACTAAC-Box" und der 3' Spleißstelle sind weniger gut untersucht. Durch Sequenzvergleiche lassen sich die bisher bekannten 3' Intronsequenzen in eine kurze und eine lange Klasse einteilen, wobei die langen 3' Intronsequenzen eine auffällige Häufung von Uridinresten am 3' Ende besitzen (Parker und Patterson, 1987). Neun Nukleotide 5' von der Intron/Exon-Grenze entfernt findet sich sogar ein zu 100 % konservierter Uridinrest (...UNNNNNU/CAG...). Für diese langen 3' Intronsequenzen konnte gezeigt werden, daß auch nicht konservierte Sequenzen zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle auf die Spleißeffizienz einen Einfluß haben (Cellini et al., 1986a). Doch scheint der oben erwähnte uridinreiche Bereich der 3' langen Intronsequenzen dabei keine so entscheidende Rolle zu spielen wie die entsprechende Pyrimidinfolge bei höheren Eukaryonten, da große Teile der 3' Intronsequenz des Actingens ohne Auswirkungen auf den Spleißvorgang deletiert werden können (Fouser und Friesen, 1987; Thompson-Jäger und Domdey, 1987).

Die kurzen 3' Intronsequenzen im ersten und zweiten Intron des *MATa1* Gens besitzen nicht die oben erwähnte Häufung von Uridinresten. Der Abstand zwischen dem internen Verzweigungspunkt und der 3' Spleißstelle beträgt im ersten Intron sieben Nukleotide (TACTAAC...7...CAG) und im zweiten Intron sechs Nukleotide (TACTAAC...6...TAG). Vergleicht man die Intronlängen von *Saccharomyces cerevisiae* mit denen von *Schizosaccharomyces pombe*, so findet man bei *S. pombe* im ersten Intron des *NDA3* Gens einen kürzeren Abstand zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle (CTAAT...3...TAG; Gallwitz et al., 1987). Auch die Gesamtlänge einer intervenierenden Sequenz kann bei *Schizosaccharomyces pombe* kleiner sein als bei *Saccharomyces cerevisiae*. Während aufgrund der hier beschriebenen Resultate das zweite Intron des *MATa1* Gens (52 Nukleotide) als das kleinste korrekt spleißbare Intron von *Saccharomyces cerevisiae* angesehen werden kann, gibt es bei der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* Intronsequenzen die noch kleiner sind. So besitzt zum Beispiel das erste Intron des *YPT2* Gens eine Länge von nur 44 Nukleotiden und das erste Intron des *NDA3* Gens eine Gesamtlänge von nur 36 Nukleotiden (Hiroaka et al., 1984; Lehmeier 1986; Gallwitz et al., 1987). Diese Introns in *Schizosaccharomyces pombe* weisen auch kürzere Distanzen zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt auf, als sie für *Saccharomyces cerevisiae* ermittelt worden waren (siehe oben).

Ein Grund für diese unterschiedlichen Längen- bzw. Distanzanforderungen könnten darin liegen, daß die U1. und U2 homologen RNAs (snR19 und snR20) von *Saccharomyces cerevisiae* wesentlich größer sind als die U1 RNA und U2 RNA bei *Schizosaccharomyces pombe* und den höheren Eukaryonten. Die Tatsache, daß sowohl für die U1 RNA als auch für die U2 RNA eine direkte Basenpaarung bei der Initiation der Spleißreaktion nachgewiesen

4.1.2 Alternative Spleißreaktionen

Am Beispiel des *MATa1* Gens konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen werden, daß es auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* alternative Spleißprozesse gibt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das zu dem kryptischen 5' Spleißsignal im ersten Exon gespleißte alternative mRNA Produkt nicht nur in vitro, sondern auch in vivo auftritt. Zwar war es nicht möglich, die alternativen Spleißprodukte zu isolieren und durch Sequenzierung direkt nachzuweisen, doch entsprechende Kontrollexperimente mit Konstrukten, bei denen entweder die kryptische 5' Spleißstelle oder die gesamte intervenierende Region deletiert worden war, konnten die Existenz dieses alternativen Spleißproduktes bestätigen.

Die kryptische 5' Spleißstelle (GTATGG) im ersten Exon des *MATa1* Gens an Position 1550 weicht nur in einer Position von der Konsensus-Sequenz (GTATGT) ab, und dürfte somit durchaus ein geeigneter Kompetitor zur eigentlichen 5' Spleißstelle sein. Mehrere Gründe sprechen für diese Annahme. 1. Die GTATGT-Regel gilt auch für *Saccharomyces carlsbergiensis*, doch gibt es dort im ribosomalen Protein S10-2 eine 5' Spleißstelle (GTATGA), die ebenfalls an Position sechs von der GTATGT-Regel abweicht. 2. Die Position vier in der GTATGT-Sequenz ist auch bei *Saccharomyces cerevisiae* nicht zu 100 % konserviert (GTACGT beim ribosomalen Protein Rp51-2; Pikielny et al., 1983). 3. Das Auftreten des alternativen mRNA Spleißprodukts bei allen "spleißbaren" *MATa1* Konstrukten, die die kryptische 5' Spleißstelle besitzen, zeigte schließlich eindeutig, daß auch die Sequenz GTATGG als 5' Spleißstelle erkannt werden kann.

Bei Position 1547 im ersten Exon des *MATa1* Gens gibt es eine weitere kryptische 5' Spleißstelle (GTAGT). Obwohl es auch für die Benutzung dieser kryptischen 5' Spleißstelle experimentelle Hinweise gab, konnten die durchgeführten Kontroll-experimente nicht ausschließen, daß das beobachtete 42 Nukleotide lange cDNA Transkript nicht auch durch reverse Transkription entlang eines korrekt gespleißten mRNA Produktes entstanden ist.

Über die Effizienz, wie gut die kryptische 5' Spleißstelle bei Position 1550 erkannt und benutzt wird, läßt sich nur schwer eine eindeutige Aussage machen. Alle durchgeführten Untersuchungen belegen jedoch, daß nur in sehr geringen Ausmaß zu der kryptischen 5' Spleißstelle gespleißt wird, wobei diese geringere Effizienz mehrere Ursachen haben kann. Einerseits ist anzunehmen, daß die veränderte Position Nummer 6 des kryptischen 5' Spleißsignals eine verringerte Spleißeffizienz bedingen kann, andererseits könnte auch die Anwesenheit des hauptsächlich benutzten 5' Spleißsignals hinderlich wirken. Eindeutig zu klären wäre dies nur durch weitere Experimente mit Mutanten, bei denen entweder anstelle des kryptischen 5' Spleißsignals eine "normale" 5' Spleißstelle vorliegt, oder indem die hauptsächlich benutzte 5' Spleißstelle deletiert wird. Solche Experimente mit mehreren 5' Spleißstellen in einer Vorläufer-mRNA könnten dann auch unter Umständen über die Kriterien bei der Auswahl der 5' Spleißstelle Aufschluß geben.

4.1.3 Zelltypspezifische Spleißreaktionen

Eine Fragestellung, die sich während der Arbeit durch die Entdeckung der alternativen Spleißprodukte stellte, war, ob diese mRNA Produkte vielleicht zelltypspezifischer Natur sind. Der Grund, warum gerade ein solcher Effekt untersucht werden sollte, lag in der zelltypspezifischen Natur des *MATa1* Gens begründet. In *MAT α* Zellen wird das *MATa1* Gen nicht exprimiert, da es hier nicht im *MAT* Locus liegt, in *MATa* Zellen wird es zwar exprimiert, es ist jedoch keine Funktion bekannt und in diploiden *MATa/ α* Zellen besitzt es mehrere verschiedene Funktionen. Die auf diese Fragestellung hin gezielt durchgeführten *in vitro* Spleißanalysen in *MATa* bzw. *MAT α* Spleißextrakten ergaben jedoch keinerlei Hinweise darauf, daß sich *MATa* von *MAT α* Zellen bezüglich ihres Spleißverhaltens unterscheiden. Es waren zumindest beim Vergleich der Spleißprodukte und Spleißeffizienzen des *MATa1* Gens und des *Actingens* keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Zukünftige Experimente sollten sich deshalb vor allem auf das Spleißverhalten des *MATa1* Gens in Zellextrakten aus diploiden Zellen konzentrieren, da in diesen Zellen das *MATa1* Gen mehrere Funktionen ausübt. Vielleicht können dann die alternativen Spleißprodukte mit verschiedenen biologischen Funktionen, etwa der *HO*- oder $\alpha 1$ -Repression in diploiden Zellen, in Verbindung gebracht werden.

4.2 Intronfunktion

Neben der oben erwähnten alternativen Spleißreaktion zum kryptischen 5' Spleißsignal im ersten Exon des *MATa1* Gens wurde auch "exon-skipping" beobachtet, d. h., daß ein geringer Teil der RNA so prozessiert wird, daß zusammen mit den beiden intervenierenden Sequenzen auch das zweite Exon herausgeschnitten wird. Dieser Prozeß konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden.

Bei höheren Eukaryonten spielen solche alternativen Spleißprozesse eine sehr große Rolle. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, gibt es viele Beispiele, in denen durch alternatives Spleißen zelltyp- oder stadienspezifische Genprodukte erzeugt werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen von chromosomalen *MATa1* Mutanten, bei denen die intervenierenden Sequenzen des *MATa1* Gens exakt deletiert worden waren, sprechen jedoch eher gegen die Möglichkeit, daß die gefundenen alternativen Spleißprodukte bei der Hefe eine biologisch relevante Funktion besitzen. Denn es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß chromosomale *MATa1* Hefemutanten, bei denen entweder eines der beiden Introns oder beide Intronsequenzen exakt deletiert waren, durchaus in der Lage waren, sich als haploide Zellen vegetativ zu vermehren. Weiter konnte gezeigt werden, daß diese Hefemutanten in der Lage waren, ganz normal mit *MAT α* Zellen zu konjugieren, als diploide Zellen zu sporulieren und schließlich auszukeimen. Durch Tetradenanalysen und

anschließende Southernblot-Hybridisierungen konnte außerdem bestätigt werden, daß die Mutationen entsprechend den Mendelschen Gesetzen stabil weitervererbt werden. Dieses Ergebnis bestätigt somit indirekt die Annahme, daß die oben beschriebenen alternativen Spleißprodukte keinen Einfluß auf die Konjugation, Sporulation und Germination haben können, da ohne die entsprechenden Intronsequenzen keine alternativen Spleißprodukte gebildet werden können.

Alle bisher durchgeführten und in der Literatur beschriebenen Experimente konnten somit für die Intronsequenzen im *MATa1* Gen keine biologische Funktion aufzeigen. Es konnte nur gezeigt werden, daß sie ohne offensichtliche Effekte entfernt werden können, bzw. für bestimmte biologische Funktionen entfernt werden müssen. Belege hierfür wurden von S.S. Ner (Vancouver) erbracht, indem er zeigen konnte, daß durch die Zerstörung der internen Erkennungsregion des zweiten Introns im *MATa1* Gen der Spleißprozeß blockiert wird, und eine solche Hefemutante einen sporulationsnegativen Phänotyp besaß (S.S. Ner, persönliche Mitteilung).

Warum also entfernt die Hefe diesen "unnötigen Ballast" an intervenierenden Sequenzen nicht schon auf DNA-Ebene? Da dies offensichtlich nicht passiert, muß ein Selektionsdruck auf den Erhalt der Intronsequenzen im *MATa1* Gen postuliert werden. Wie dieser Selektionsdruck jedoch aussieht, darüber läßt sich im Falle des *MATa1* Gens momentan nur spekulieren.

Bei den introntragenden tRNA Genen in *Saccharomyces cerevisiae* scheint man dieser Frage etwas näher gekommen zu sein. So gibt es Anzeichen dafür, daß ein positiver Selektionsdruck auf den Erhalt der Introns in Hefe tRNA Genen dadurch erfolgt, indem die Intronsequenzen für die korrekte Modifizierung der tRNA Moleküle notwendig sind (Johnson und Abelson, 1983). Auch bei höheren Eukaryonten (*Drosophila melanogaster*) konnte nachgewiesen werden, daß die Anwesenheit einer beliebigen Intronsequenz für die Pseudouridin-Modifikation im Antikodon der tRNA^{Tyr} notwendig ist (Choffat et al., 1988). Eine andere Art von Intronfunktion und damit auch Selektion auf Erhalt einer Intronsequenz zeigt das SV40 Virus. Durch die exakte Deletion eines Introns im SV40 Genom konnten keine stabilen "späten" viralen Transkripte akkumuliert werden (Gruss et al., 1979). Durch die Reinsertion eines heterologen Introns konnte dieser Effekt jedoch rückgängig gemacht werden (Gruss und Khoury, 1980). Ein weiteres Beispiel einer Intronfunktion ist die Anwesenheit eines transkriptionsaktivierenden Elementes ("enhancer") im Intron von Immunglobulinen (Gillies et al., 1983). Neben weiteren Möglichkeiten der Intronfunktion sollten im Falle des *MATa1* Gens vor allem die mögliche Funktion der alternativen Spleißprodukte näher untersucht werden. Besonders in diploiden Hefezellen, wo das *MATa1* Genprodukt zusammen mit dem Genprodukt von *MATa2* mehrere verschiedene Aufgaben, wie die Repression von $\alpha 1$, Repression von *HO* und Aktivierung der sporulationsspezifischen Gene, erfüllt, wäre die Beteiligung alternativ prozessierter und möglicherweise translaterter *MATa1* Genprodukte durchaus denkbar.

5. MATERIALIEN

5.1 *E. coli* Stämme und Hefestämme

Folgende Bakterien- und Hefestämme wurden in der vorliegenden Arbeit zur Vermehrung von Plasmiden, Phasmiden, Phagen und zur Analyse von chromosomal kodierten Hefegenen benutzt.

Bakterienstämme

JM83	<i>ara</i> , $\Delta(lac-proAB)$, <i>rpsL</i> (= <i>strA</i>), $\phi 80$, <i>lacZ</i> Δ M15; (Messing, 1979)
JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$, [<i>F'</i> ; <i>traD</i> 36, <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Δ M15]; (Messing, 1979)
JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA</i> 96, <i>thi</i> , <i>hsdR</i> 17, <i>supE</i> 44, <i>relA1</i> , λ -, $\Delta(lac-proAB)$, [<i>F'</i> ; <i>traD</i> 36, <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Δ M15]; (Yanisch-Peron, 1985)
NM539	<i>supF</i> , <i>hsdR</i> , (<i>P2cox3</i>); (Frischauf et al., 1983)
Y1090	$\Delta lacU169$, <i>proA</i> ⁺ , Δlon , <i>araD</i> 139, <i>strA</i> , <i>supF</i> , <i>trpC</i> 22::Tn10, <i>pMC9</i> ; (Young und Davis, 1983)
WK6	$\Delta(lac-proAB)$, <i>galE</i> , <i>strA</i> / <i>F'</i> <i>lacI</i> ^q , Δ M15, <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ ; (Fritz, et al., 1988)
WK6/MUTS	$\Delta(lac-proAB)$, <i>galE</i> , <i>strA</i> , <i>mutS</i> 215::Tn10 / <i>F'</i> <i>lacI</i> ^q , Δ M15, <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ ; (H.-J. Fritz, München)
M13K07	Helferphagen (Pharmacia)

Hefestämme

KN79	<i>MAT</i> α , <i>HML</i> α , <i>HMR</i> α , <i>leu2-1</i> (o), <i>trp1-1</i> (a); (Nasmyth et al., 1981b)
KN79*	<i>MAT</i> α , <i>leu2-1</i> (o), <i>trp1-1</i> (a); (diese Arbeit)
KN79*/S	<i>mata</i> , <i>leu2-1</i> (o), <i>trp1-1</i> (a); (diese Arbeit)
KN79*/R	<i>mata</i> , <i>SUP6</i> , <i>trp1-1</i> (a); (diese Arbeit)
KN79*/ Δ IVS1	<i>mata</i> , <i>leu2-1</i> (o), <i>trp1-1</i> (a); (diese Arbeit)
KN79*/ Δ IVS2	<i>mata</i> , <i>leu2-1</i> (o), <i>trp1-1</i> (a); (diese Arbeit)
KN79*/ Δ IVS1,2	<i>mata</i> , <i>leu2-1</i> (o), <i>trp1-1</i> (a); (diese Arbeit)
IIIC	<i>MAT</i> α , <i>arg1</i> , <i>thr1</i> ; (M. Breitenbach, Wien)
IIIA	<i>MAT</i> α , <i>arg1</i> , <i>thr1</i> ; (M. Breitenbach, Wien)

EJ101(20B-12-1)	<i>MATα</i> , <i>trp1</i> , <i>pro1</i> -126, <i>prb1</i> -112, <i>pep4</i> -3, <i>prc1</i> -126; (Lin et al., 1985)
IM1783	<i>MATα</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>his4</i> , <i>can1</i> ; (U. Vijayraghavan, Caltec)
IM1784	<i>MATα</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>his4</i> , <i>can1</i> ; (U. Vijayraghavan, Caltec)
J401	<i>MATα</i> , <i>ura3</i> -52, <i>his3</i> , <i>his7</i> , <i>ade3</i> , <i>rna2</i> -1; (Lin et al., 1985)
DH484	<i>MATα</i> , <i>ade2</i> -1 (o), <i>leu2</i> -3, <i>leu2</i> -112, <i>can1</i> -100, <i>trp5</i> -48 (o), <i>ura4</i> -11, <i>lys1</i> -1 (o); (Domdey et al., 1984)
DBY874	<i>MATα</i> , <i>his5</i> -2 (o), <i>leu2</i> -1 (o), <i>can1</i> -100 (o), <i>ura3</i> -52, <i>trp5</i> -48 (o); (Johnson und Abelson, 1983)
F808(BWG1-7A)	<i>MATα</i> , <i>leu2</i> -2, <i>leu2</i> -112, <i>his4</i> -519, <i>ade1</i> -100, <i>ura3</i> -52; (Guarente und Mason, 1983)

* Diese Stämme tragen eine Mutation im *MAT α 1* Gen.

5.2. Enzyme und Chemikalien

Acrylamid	Biomol Feinchemikalien GmbH (Ilvesheim)
Agar	Difco Laboratories (Detroit)
Agarose high EEO	Serva Feinbiochemica GmbH und Co. (Heidelberg)
Aminosäuren	Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxydisulfat	Merck (Darmstadt)
Analytical Grade Mixed Bed Resin AG 501-X8(D)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Ampicillin	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Chloramphenicol	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Bacto Agar	Difco Laboratories (Detroit)
Bacto Pepton	Difco Laboratories (Detroit)
Bacto Trypton	Difco Laboratories (Detroit)
Biogel-A-5m 100-200 mesh	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Bisacrylamid	Serva (Heidelberg)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
BSA	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
m ⁷ GpppG	New England Biolabs (Schwalbach)
Casaminosäuren	Difco Laboratories (Detroit)
CaCl ₂	Merck (Darmstadt)
CsCl	Biomol Feinchemicalien GmbH (Ilvesheim)
Chloramphenicol	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
CIP (alkalische Phosphatase)	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)

DEAE Biogel A 100-200 mesh	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Dextransulfat	Pharmacia GmbH (Freiburg)
Dextrose	Bonz und Sohn GmbH (Böblingen)
Dichlordimethylsilan	Merck (Darmstadt)
DMSO	Fluka Feinchemikalien (Neu Ulm)
DNA Polymerase I	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
DNase I	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
dNTPs/ddNTPs	Pharmacia GmbH (Freiburg)
DTT	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
<i>E. coli</i> tRNA	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
EDTA (Titriplex III)	Merck (Darmstadt)
Eisessig	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
EtBr	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
Ethanol	Riedel-de Haen AG (Seelze)
FeCl ₃	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
Ficoll 400 000	Pharmacia GmbH (Freiburg)
Formamid	J. T. Baker Chemicals B.V. (Deventer Holland)
Gelatine	Merck (Darmstadt)
γ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan,	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Glusulase (β -Glucuronidase/	
Arylsulfatase)	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Glycerin	Riedel-de Haen AG (Seelze)
Glycogen	Renner (Darmstadt)
Eastman-Kodak Glyoxal	Atlanta Chemie & Handels GmbH (Heidelberg)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Hexaminkobaltchlorid	Fluka Feinchemikalien (Neu Ulm)
HEPES	Serva Feinbiochemica GmbH und Co. (Heidelberg)
Heringssperma-DNA	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Hexadeoxyribonukleotid-	
gemisch (# 2166)	Pharmacia GmbH (Freiburg)
8-Hydroxychinolin	Merck (Darmstadt)
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
K-Acetat	Riedel-de Haen AG (Seelze)
KCl	Merck (Darmstadt)
Li-Acetat	Merck (Darmstadt)

LMP-Agarose	Bethesda Research Laboratories (Eggenstein)
Lysozym	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
MES	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Mung Bean Nuklease	PL Biochemicals, Inc. (Milwaukee)
Na-Citrat	Merck (Darmstadt)
NaCl	Merck (Darmstadt)
Nalidixinsäure	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
MnCl ₂	Merck (Darmstadt)
MgSO ₄	Merck (Darmstadt)
NH ₄ Cl	Merck (Darmstadt)
Nitrogen base w/o amino acids	Difco Laboratories (Detroit)
NZ-Amin A	Otto Aldag (Hamburg)
Oligo(dT)-Cellulose	Collaborative Research Inc (St. Lexington, MA)
PEG 6000 und PEG 4000	Serva Feinbiochemica GmbH und Co. (Heidelberg)
PIPES	Serva Feinbiochemica GmbH und Co. (Heidelberg)
Phenol	Riedel-de Haen AG (Seelze)
Polyvinylpyrrolidon	Merck (Darmstadt)
Proteinase K	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
RbCl	Fluka Feinchemikalien (Neu Ulm)
Reverse Transkriptase (AMV)	Life Sciences (USA)
RNase A	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
RNasin	Amersham Buchler GmbH und Co. KG (Braunschweig)
SDS	Serva Feinbiochemica GmbH und Co. (Heidelberg)
Sequenase™	United Sates Biochemica Corporation (USA)
Sequenase-Kit	United Sates Biochemica Corporation (USA)
Sorbitol	Merck (Darmstadt)
SP6 Polymerase	Amersham Buchler GmbH und Co. KG (Braunschweig)
Spermidin	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Schwalbach)
T4 Polynukleotidkinase	New England Nuclear (Dreieich)
TEMED	Serva Feinbiochemica GmbH und Co. (Heidelberg)
Thiamin	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Tetracyclin	Fluka Feinchemikalien (Neu Ulm)
Tri-Na-Citrat	Merck (Darmstadt)
Tris-HCl	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
Triton X-100	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tryptikase	BBL Microbiology Systems, Becton Dickinson and Co.
X-Gal	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Xylencyanol	Biorad Laboratories GmbH (München)

Yeast Extract	Difco Laboratories (Detroit)
ZnCl ₂	Merck (Darmstadt)
Zymolyase 100T	Miles Inc. (USA)

5.3 Oligodeoxynukleotide

Ausgenommen von den pSP64 und M13 Sequenzierungsprimern (Boehringer Mannheim) und dem "Random Hexamer Oligodeoxyribonukleotid" Gemisch (Pharmacia), wurden alle Oligodeoxynukleotide am Genzentrum der Universität München von der Arbeitsgruppe R. Mertz synthetisiert.

pSP64 Sequenzierprimer:

5'-ACCTTATGTATCATACACAT-3'

M13/pUC Vorwärtsprimer:

5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

M13/pUC Rückwärts-Primer:

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

MAT Sequenzierprimer 1: Initiiert im 1. Exon in Richtung Intron.

5'-TAGGTACTGAGATTGATG-3'

MAT Sequenzierprimer 2: Initiiert im 3. Exon in Richtung Intron.

5'-GAAAAACCCGACTATGC-3'

E2: Initiiert im 2. Exon in Richtung 1. Intron.

5'-CTTTAGTCAAATTACTTTCCA-3'

E3: Initiiert im 3. Exon in Richtung Intron.

5'-GATCTCATACGTTTATTTATG-3'

SEQE3: Probe für das Screening nach dem Gen für ein ribosomales Protein

Hybridisiert an Position 1599-1625. (Vgl. Abb. 27)

5'-TAATAATTAAATCTAAGCTTCAACTGG-3'

Rib1: Sequenzierprimer für ribosomales Protein.
Hybridisiert an Position 1211-1230. (Vgl. Abb. 27)
5'-CCAAACCGTTCAACAATTTG-3'

Rib2: Sequenzierprimer für ribosomales Protein.
Hybridisiert an Position 898-916. (Vgl. Abb. 27)
5'-CTTTTCTTAGAGATTAAAG-3'

Rib3: Sequenzierprimer für ribosomales Protein.
Hybridisiert an Position 744-764. (Vgl. Abb. 27)
5'-CATTGATTTGGAAAATTACC-3'

Rib4: Sequenzierprimer für ribosomales Protein.
Hybridisiert an Position 994-1009. (Vgl. Abb. 27)
5'-CGGACTTCAACACCGG-3'

Rib5: Sequenzierprimer für ribosomales Protein.
Hybridisiert an Position 323-340. (Vgl. Abb. 27)
5'-CAAGGTATGTTGACCCTC-3'

Die folgenden Oligodeoxynukleotide wurden für in vitro Mutagenese Experimente benutzt. Homologe Bereiche sind in Großbuchstaben und nicht homologe in Kleinbuchstaben dargestellt. Ein Bindestrich soll symbolisieren, daß an dieser Stelle die Matrizen DNA zusätzliche Sequenzen besitzt.

E1-2: Mutagenese-Oligodeoxynukleotid zur Deletion des 1. Introns.
5'-CTTTCCATTATAAA-ATTATAAAGA-3'

E2-3: Mutagenese-Oligodeoxynukleotid zur Deletion des 2. Introns.
5'-CGTTTATTTATGAA-CCAAACTC-3'

MB: Mutagenese-Oligodeoxynukleotid zur Erzeugung einer BamHI-Restriktionsschnittstelle im 1. Exon.
5'-GTTGTCCTTCTGgATccTCTTTGATATA-3'

MS: Mutagenese-Oligodeoxynukleotid zur Erzeugung einer SmaI-Restriktionsschnittstelle im 1. Intron.

5'-GTAAATTGATTCCcgGGCTATCCITG-3'

7C: Mutagenese-Oligodeoxynukleotid zum Austausch von 7 Nukleotiden zwischen 5' Spleißstelle und internem Verzweigungspunkt.

5'-GTTAGTAAATTGATTCAAtccgataCCTTGAATGAAAAC-3'

Δ7A: Mutagenese-Oligodeoxynukleotid zur Insertion von 7 Nukleotiden zwischen internem Verzweigungspunkt und 3' Spleißstelle.

5'-CCATTATAAACTGAAaggctatGTATTGTTAGTAAATT-3'

5.4 DNA Längenstandards und Vektoren

Die aufgelisteten DNA Längenstandards wurden bei der Firma Boehringer Mannheim fertig gekauft, bzw. die ungeschnittene DNA, die dann noch mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten wurde.

Fragment #	(λII) λ x HindIII (Kbp)	(λIII) λ x EcoRI/HindIII (Kbp)	φX174 x HaeIII (bp)	pBR322 x HpaII (bp)
1.	23,13	21,22	1353	622
2.	9,41	5,14	1078	527
3.	6,55	4,97	872	404
4.	4,37	4,27	603	309
5.	2,32	3,53	310	242
6.	2,02	2,02	281	238
7.	0,56	1,90	271	217
8.	0,12	1,58	234	201
9.		1,33	194	190
10.		0,98	118	180
11.		0,83	72	160
12.		0,54		147
13.		0,12		123
14.				110
15.				90
16.				76
17.				67
18.				34
19.				26
20.				15
21.				9

Folgende Vektoren wurden in dieser Arbeit benutzt:

pUC12/13	(Vieira, 1982)
pUC18/19	(Yanisch-Peron et al., 1985)
pBR322	(Bolivar et al., 1977)
M13mp19	(Yanisch-Peron et al., 1985)
pSP64/65	(Melton, 1984)
Yep13	(Broach, 1979)
pMa/c58/R	(J. Thierack, München)

5.5 Genbanken

1. λ gt11 genomische Hefe-Genbank von Clontech
2. genomische Hefe-Genbank von Michael Duchêne in λ EMBL3A

5.6 Radiochemikalien

Sämtliche Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler bezogen.

α [^{32}P]-Deoxyadenosintriphosphat (α -dATP)

Spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

α [^{32}P]-Deoxycytidintriphosphat (α -dCTP)

Spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

α [^{32}P]-Uridintriphosphat (α -UTP)

Spezifische Aktivität: 800 Ci/mmol; 20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

γ [^{32}P]-Adenosintriphosphat (γ -ATP)

Spezifische Aktivität: 4995 Ci/mM; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

α [^{35}S]-Deoxyadenosintriphosphat (α -dATP)

Spezifische Aktivität: 650 Ci/mmol; 8.1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

5.7 Standardlösungen, Puffer und Medien

TE (pH 8.0):

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

TBE (pH 8.0):

89 mM Tris-HCl
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

0.5 M Na-Phosphat Puffer (pH 6.5):

Lsg. B: 0.5 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
Lsg. B: 0.5 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
- 1 Vol. Lsg. A + 1 Vol. Lsg. B

SM-Puffer:

5.8 g/l NaCl
2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
50 ml/l 1 M Tris-HCl (pH 7.5)
5 ml/l 2 % Gelatine
- autoklavieren

20 x SSC:

3 M NaCl
0.3 M Na-Citrat
- mit 0.1 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt

URP:

33 mM Tris-Acetat (pH 7.8)
66 mM K-Acetat (pH 7.8)
10 mM Mg-Acetat (pH 7.8)
0.5 mM DTT
0.1 mg/ml BSA

10 x Niedrigsalzpuffer:

100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
100 mM MgCl_2
10 mM DTT

10 x Mittelhoher Salzpuffer:

500 mM NaCl
100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

10 x Hochsalzpuffer:

1000 mM NaCl
500 mM Tris-HCl (pH 7.5)
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

10 x SmaI-Puffer:

200 mM KCl
100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

10 x Erhöhungspuffer von Niedrig- auf Hochsalzbedingungen:

1000 mM NaCl
400 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 x Erhöhungspuffer von Mittelhoch- auf Hochsalzbedingungen:

500 mM NaCl
400 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 x Polymerase I-Puffer:

600 mM Tris-HCl (pH 7.5)
80 mM MgCl₂
10 mM DTT

5 x Klenow-Puffer (bei M13-Mutagenese):

500 mM HEPES (pH 7.5)
33 mM MgCl₂
250 mM NaCl
5 mM 2-Mercaptoethanol

10 x Auffüllpuffer:

625 mM KCl
275 mM Tris-HCl (pH 7.5)
150 mM MgCl₂
20 mM DTT
0.5 mM ATP
0.25 mM dNTPs

10 x Phosphatase-Puffer:

0.5 M Tris-HCl (pH 9.0)
10 mM MgCl₂
1 mM ZnCl₂
10 mM Spermidin

10 x Ligase-Puffer:

0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)
100 mM MgCl₂
100 mM DTT
10 mM ATP
0.5 mg/ml BSA

10 x SP6-Puffer:

400 mM Tris-HCl (pH 7.5)
20 mM Spermidin
60 mM MgCl₂
100 mM DTT
100 µg/ml BSA, acetyliert

10 x STE-Puffer:

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 M NaCl
10 mM EDTA

Formamidauftragungspuffer:

98 % Formamid (deionisiert)
0.1 % Bromphenolblau
0.1 % Xylencyanol

6 x Auftragspuffer Typ III:

0.25 % Bromphenolblau

0.25 % Xylencyanol

30 % Glycerin

HSB-Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

0.2 % SDS

5 mM EDTA

0.5 M NaCl

ELU-Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

0.2 % SDS

1 mM EDTA

Chloropane:

50 % Phenol

50 % Chloroform

0,05 % 8-Hydroxychinolin

- äquilibriert mit ANE-Puffer

- ANE-Puffer (pH 6.0):

0.01 M Na-Acetat

0.1 M NaCl

0.001 M EDTA

Phenol / TE:

70 % Phenol

30 % TE (pH 8.0)

0.01 % 8-Hydroxychinolin

"Hot"-Phenol:

1 kg Phenol äquilibriert 500 ml Na-Acetat-Puffer (pH 5.0)

Na-Acetat-Puffer (für "Hot"-Phenol):

50 mM Na-Acetat (pH 5.0)

10 mM EDTA

Acrylamid / Harnstoff Lösungen:

5 % Acrylamid (AA:Bis = 29:1), 8 M Harnstoff:

1.66 g N,N'-Methylenbisacrylamid

48.33 g Acrylamid

480.48 g Harnstoff

20 % Acrylamid (AA:Bis = 29:1), 8 M Harnstoff:

6.65 g N,N'-Methylenbisacrylamid

193.3 g Acrylamid

480.48 g Harnstoff

6 % Acrylamid (AA:Bis = 29:1), 7 M Harnstoff:

3 g N,N'-Methylenbisacrylamid

57 g Acrylamid

420 g Harnstoff

Alle obengenannten Acrylamidlösungen wurden in einem Gesamtvolumen von 900 ml Wasser gelöst, über Analytical Grade Mixed Bed Resin Bio-Rad AG 501-X8 (D) 30 Min gerührt, 100 ml 10 x TBE zugesetzt und filtriert.

Siliconisierlösung:

5 % Dichlordimethylsilan in Chloroform

Silanisierlösung:

19 µl γ-Methacryloxypropyl-Trimethylsilan

190 µl 10 % Essigsäure

6.5 ml Ethanol

Lösungen und Puffer für radioaktive Markierungen**NTE-2:**

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA

0.2 M NaCl

NTE-5:

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA

0.5 M NaCl

OLB-Lösung:

Lösung A : B : C = 100 : 250 : 150

Lösung O: 1.25 M Tris-HCl (pH 8.0)
0.125 M MgCl₂

Lösung A: 1 ml Lösung O
18 µl 2-Mercaptoethanol
je 5 µl dATP, dTTP, dGTP (100 mM)

Lösung C: 90 OD₂₆₀/ml Hexamer-Deoxyribonukleotid-Gemisch

Lösung B: 2 M HEPES mit NaOH auf pH 6.6 eingestellt

OLB-Stopplösung:

20 mM NaCl
20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
2 mM EDTA
0.25 % SDS
1 µM dCTP

10 x Kinase-Puffer:

0.5 M Tris-HCl (pH 7.6)
0.1 M MgCl₂
50 mM DTT
1 mM Spermidin
1 mM EDTA

Vorhybridisierungs- und Hybridisierungslösungen für Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Oligodeoxynukleotiden

Vorhybridisierung:

6 x SSC (siehe oben)
0.2 % SDS
0.2 % BSA
0.2 % Ficoll
0.2 % Polyvinylpyrrolidon

Hybridisierung:

6 x SSC
 0.2 % SDS
 0.1 % BSA
 0.1 % Ficoll
 0.1 % Polyvinylpyrrolidon

BFP-Mix:

3.3 % BSA
 3.3 % Ficoll 400 000
 3.3 % Polyvinylpyrrolidon

Vorhybridisierungs- und Hybridisierungslösungen für Hybridisierungen mit radioaktiv markierter dsDNA

Vorhybridisierung:

50 % Formamid (deionisiert über AG 501-X8 Mixed Bed Resin)
 5 x SSC
 je 0.2 % Polyvinylpyrrolidon, Ficoll 400 000, BSA
 50 mM Na-Phosphat (pH 6.5)
 0.2 % SDS
 100 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA

Hybridisierung:

50 % Formamid (deionisiert über AG 501-X8 Mixed Bed Resin)
 5 x SSC
 je 0.2 % Polyvinylpyrrolidon, Ficoll 400 000, BSA
 50 mM Na-Phosphat (pH 6.5)
 0.2 % SDS
 10 % Dextransulfat
 5 mM EDTA
 100 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA und denaturierte radioaktive Probe

Medien für Bakterien- und Phagenkulturen

LB-Medium:

- 10 g/l Bacto Trypton
- 5 g/l Bacto Yeast Extract
- 5 g/l NaCl
- 15 g/l Agar (nur für LB-Platten)
- autoklavieren

für LB-Ampicillinplatten:

- + 1 ml/l Ampicillin (100 mg/ml)

für LB-Chloramphenicolplatten:

- + 1 ml/l Chloramphenicol (25 mg/ml)

NZ-Medium:

- 10 g/l NZ-Amine
- 5 g/l NaCl
- 5 g/l Yeast Extract
- 1 g/l Casaminoäuren
- 2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
- mit NaOH auf pH 7.5 einstellen und autoklavieren

2 x YT:

- 16 g/l Bacto Trypton
- 10 g/l Bacto Yeast Extract
- 5 g/l NaCl
- autoklavieren

H-Weichagar:

- 10 g/l Bacto Trypton
- 8 g/l NaCl
- 8 g/l Agar
- autoklavieren

H-Platten:

10 g/l Bacto Trypton

8 g/l NaCl

12 g/l Agar

- autoklavieren und in sterile Petrischalen gießen

Tryptikase-Platten:

5 g/l NaCl

10 g/l Tryptikase

12 g/l Agar

- autoklavieren und in sterile Petrischalen gießen

Tryptikase-Weichagarose:

5 g/l NaCl

10 g/l Tryptikase

7 g/l Agarose

- autoklavieren

Weichagarose:

10 g/l Bacto Trypton

5 g/l Bacto Yeast Extract

5 g/l NaCl

8 g/l Agarose

- autoklavieren

M9 Minimalmedium:

100 ml/l 10 x Salze (siehe unten)

2 ml/l MgSO_4 (1 M)

10 ml/l Glucose 20 %

0.1 ml/l CaCl_2 (1 M)

15 g/l Agar (nur für Kulturplatten)

- autoklavieren

- + 1 ml/l Thiamin (1 %)

- + 2 ml/l FeCl_3 (100 μM)

- + 1 ml/l Nalidixinsäure (40 mg/ml, nur für JM109)

10 x Salze: 60 g/l Na_2HPO_4
 30 g/l KH_2PO_4
 5 g/l NaCl
 10 g/l NH_4Cl
 - auf pH 7.4 einstellen und autoklavieren

Medien für Hefekulturen

YPD-Vollmedium:

1 % Bacto Yeast Extract
 2 % Bacto Pepton
 2 % Dextrose
 2 % Agar (nur für Kulturplatten)

YPDS-Vollmedium:

1 M Sorbit
 1 % Bacto Yeast Extract
 2 % Bacto Pepton
 2 % Dextrose
 2 % Agar (nur für Kulturplatten)

Sporulationsmedium:

1 % K-Acetat
 0.1 % Bacto Yeast Extract
 0.05 % Dextrose
 2 % Agar (nur für Kulturplatten)

Präsporulationsmedium:

0.8 % Bacto Yeast Extract
 0.3 % Bacto Pepton
 10 % Dextrose
 2 % Agar (nur für Kulturplatten)

Hefe-Minimalmedium:

0.67 % Difco Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren
 2 % Dextrose
 2 % Agar

Synthetische Hefe-Selektionsmedien:

Für die Selektion auf auxotrophe Hefemutanten werden nur die entsprechenden Aminosäuren zum Hefeminimalmedium zugesetzt.

0.67 % Difco Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	
2 % Dextrose	
2 % Agar (nur für Kulturplatten)	
	Stock-Konzentration
20 mg/l Adeninsulfat*	1.2 mg/ml
20 mg/l Uracil*	2.4 mg/ml
20 mg/l L-Tryptophan	2.4 mg/ml
20 mg/l L-Histidin-HCl	2.4 mg/ml
20 mg/l L-Arginin-HCl	2.4 mg/ml
20 mg/l L-Methionin	2.4 mg/ml
30 mg/l L-Tyrosin*	0.9 mg/ml
30 mg/l L-Leucin*	3.6 mg/ml
30 mg/l L-Isoleucin	3.6 mg/ml
30 mg/l L-Lysin	3.6 mg/ml
50 mg/l L-Phenylalanin*	3.0 mg/ml
100 mg/l L-Glutaminsäure*	6.0 mg/ml
150 mg/l L-Asparaginsäure*+	4.0 mg/ml
150 mg/l L-Valin	18 mg/ml
200 mg/l L-Threonin+	24 mg/ml
375 mg/l L-Serin	45 mg/ml

+ Wird nach dem Autoklavieren zugegeben

* Aufbewahrung bei Raumtemperatur

Lösungen und Medien für Hefetransformationen**SOS-Medium:**

YPDS-Medium mit 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- autoklavieren

Hefe-Weichagar:

Selektionsmedium mit
1 M Sorbit
2 % Agar
- autoklavieren

SE (pH 8.0):

1 M Sorbit
25 mM EDTA
- autoklavieren

SED (pH 8.0):

1 M Sorbit
25 mM EDTA
- autoklavieren
50 mM DTT

SEC (pH 5.8):

1.2 M Sorbit
10 mM EDTA
0.1 M Tri-Na-Citrat
- autoklavieren

STC (pH 7.5):

1.2 M Sorbit
10 mM Tris-HCl
10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- autoklavieren

PEG-Stammlösung:

20 % PEG MG 4 000
10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- sterilfiltrieren

Transformationspuffer-1 (pH 7.5):

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
100 mM Li-Acetat
- autoklavieren

Transformationspuffer-2:

40 % PEG 4 000
 100 mM Li-Acetat
 in TE (pH 7.5)
 - sterilfiltrieren

Lösungen zur Transformation von *E. coli* Stämmen

FSB:

10 mM K-Acetat (pH 7.0)
 100 mM KCl
 45 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 3 mM HACoCl_3 (Hexaminkobaltchlorid)
 10 % Glycerin
 - mit 0.1 M HCl auf pH 6.4 einstellen
 - sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

TFB:

10 mM K-MES (pH 6.2)
 100 mM RbCl
 45 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 3 mM HACoCl_3 (Hexaminkobaltchlorid)
 - sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

DTT-Stammlösung:

2.25 mM DTT
 40 mM K-Acetat (pH 6.0)
 - Aliquots bei -20°C lagern

5.8 Geräte

Beckman Heater zum Verschweißen der "Quickseal" Röhrchen, Beckman Instruments GmbH (München)

Beckman Mini-Ultrazentrifuge TL100 mit Rotor TLV100, Beckman Instruments GmbH (München)

Beckman Szintillationszähler Modell LS 6800, Beckman Instruments GmbH (München)

Beckman Ultrazentrifugen (L8-55M, L8-70, L8-80M) mit Rotor SW41 Ti, Beckman Instruments GmbH (München)

Brutschränke, Heraeus Christ (Gräfelfing)

Elektroblotapparatur Modell #1703910, Biorad Laboratories (München)

Elektroelutionskammer (Biotrap), Schleicher & Schüll GmbH (Dassel)

Elektrophoresekammern, Biorad Laboratories (München) und Eigenbau

Entwicklermaschine Gevomatic 110, Agfa-Gevaert (München)

Eppendorf Schüttler Modell 5432, Bachofer GmbH (Reutlingen)

Eppendorf Tischzentrifuge Modell 5414 S von Bachofer GmbH (Reutlingen)

Gradientenmischer, Eigenbau

Heraeus Christ Minifuge GL Typ 4400, Heraeus Christ (Gräfelfing)

Hybridisierestrommel, Bachofer GmbH (Reutlingen)

Hydraulischer Mikromanipulator, Bachofer GmbH (Reutlingen)

Kühlzentrifuge 2MK, Sigma GmbH (Osterode)

Mikroskop, Olympus CH, Foto Pili (München)

Photometer von Corning (Fernwald), Modell Colorimeter 252

Photometer Ultrospec II von LKB (Gräfelfing),

Polaroidkamera, Bachofer GmbH (Reutlingen)

Schüttelinkubatoren für Bakterien, Infors HT, Modell KF-4

Schüttelinkubatoren für Hefen, New Brunswick Scientific Co., Inc., Modell G25

Sorvall RC5C mit Rotoren HB4, SS34, GSA, GS3, Sorvall Instruments (Bad Nauheim)

Spannungsgeräte von Biorad (München) und GIBCO BRL (Eggenstein)

Speed-Vac Concentrator, Bachofer GmbH (Reutlingen)

UV-Transilluminator Modell UVT 2035, Herolab GmbH Laborgeräte

UV Handlampe (254/365 nm, 2x6 Watt), Bachofer GmbH (Reutlingen)

Vortex Modell K-550-GE, Bender & Hobein AG (München)

Wasserbäder, Julabo UB

Wasserbadschüttler Modell G7GD, New Brunswick Scientific Co., Inc.,

5.9 Andere mikro- und molekularbiologische Hilfsmittel

Filmkassetten von Rego und Eigenbau

Genescreen™ Hybridisierungsmembranen von New England Nuclear (NEN) Research Products (Dreieich)

Glaswolle (silikonisiert) von Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)

Glas-Homogenisatoren von Braun Melsungen AG (Schwieberdingen) und Bellco[®] (USA)

Nitrocelluloserundfilter von Schleicher und Schüll GmbH (Dassel)

Dialysemembran Spectra/Por, MW cutoff: 6000 - 8000 von Spectrum Medical Industries, Inc

Whatman 3MM™ Papier von Bender und Hobein AG (München)

Whatman DEAE Papier (DE81) von Bender und Hobein AG (München)

Petrischalen von Greiner und Söhne GmbH & Co. KG (Nürtingen)

Pipetten und Spitzen (Gilson) von Bender und Hobein AG (München)

Reaktionsgefäße (Eppendorf) von Bender und Hobein AG (München)

Röntgenfilme (Kodak X-OMAT XAR 5) von Kodak

Verstärkerfolien Typ Quanta III von Dupont de Nemours (Deutschland) GmbH (Dreieich)

Säulen (Glas und Polypropylene-Econo-Columns) von Biorad Laboratories (München)

Thomakammer von Schreck (Hofheim)

Zentrifugenbecher von Sorvall Instruments (Bad Nauheim) und Beckman Instruments GmbH (München)

6. METHODEN

6.1 Aufzucht und Konservierung von Bakterien- und Hefezellen

Für Dauerkulturen von Bakterien und Hefen wurde eine stationäre Übernachtskultur mit 1 Volumen Glycerin (87 %) gemischt und bei -70 °C gelagert.

Die Konservierung von Bakterien und Hefen über wenige Wochen erfolgte auf Agarplatten mit oder ohne Selektionsbedingungen.

Für die Aufzucht und Vermehrung der Mikroorganismen wurden Flüssigkulturen mit großzügiger Belüftung benutzt. Für Plasmidminipräparationen wurden 10 ml Reagenzgläser mit Aluminiumstopfen und für 200 ml Plasmidpräparationen 1 l Erlenmeyerkolben verwendet. Bakterienkulturen wurden generell bei 37 °C und Hefekulturen in der Regel bei 30 °C (Ausnahme: *rna2*-Mutante bei Raumtemperatur) und bei sehr guter Belüftung inkubiert.

6.2 Erzeugung diploider Hefezellen durch Konjugation ("mating") (Haber und Halvorson, 1975)

Haploide Hefezellen mit unterschiedlichen Paarungstypen (α bzw. a) sind unter bestimmten Bedingungen in der Lage zu konjugieren, d. h. zu einer diploiden a/α -Hefezelle zu verschmelzen.

Die Konjugation von Hefezellen wurde auf zwei Wegen erreicht:

1. Auf einer YPD-Platte wurden die zu konjugierenden Hefezellen als Suspension gemischt und für 6 - 12 Std bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurde ein Teil davon auf einer Selektionsplatte ausgestrichen, auf der keiner der beiden haploiden Ausgangsstämme, sondern nur diploide Hefezellen wachsen können. Diese Selektionsplatten wurden 1 - 2 Tage bei 30 °C bebrütet und dann Einzelkolonien isoliert.
2. Durch einen sterilen Aluminium-Stempel mit 96 "Füßchen" konnte aus einer Zellkulturschale mit 96 Näpfen, in dem sich verschiedene Hefeflüssigkulturen befanden, gleichzeitig auf einen konfluenten Heferasen (anderer Paarungstyp) überstempelt werden. Die Platten wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert, bevor die Zellen wieder mit dem Stempel auf Selektionsplatten übertragen wurden. Nach 1 - 2 Tagen bei 30 °C konnten dann Einzelklone isoliert werden. Ein konfluenter Heferasen wurde erzeugt, indem 1 ml logarithmisch wachsende Hefekultur ($OD_{600} = 1$) auf eine YPD-Kulturplatte (8.5 cm Durchmesser) ausplattiert und 6 bis 12 Std bei 30 °C inkubiert wurde.

6.3 Sporulationsanalysen (Haber und Halvorson, 1975)

Diploide a/α -Hefezellen sind bei Hungerbedingungen in der Lage, nach zwei meiotischen Teilungen, Ascosporen zu bilden. Diese in einer Tetrade verpackten vier Sporen stellen Dauerformen dar, die schlechte Umweltbedingungen überdauern können und bei guten Bedingungen auskeimen.

Um sporulationspositive oder -negative Phänotypen zu bestimmen oder um Tetradenanalysen durchzuführen, wurden die zu untersuchenden Hefeklonen auf Präsporulationsplatten (0.8 % Bacto Yeast Extrakt, 0.3 % Bacto Peptone, 10 % Dextrose, 2 % Agar) ausgestrichen und 1 Tag bei 30 °C inkubiert.

Einzelklone wurden anschließend in 1 ml 1 % K-Acetat-Lösung in 10 ml Plastikröhrchen suspendiert und bei 30 °C geschüttelt. Nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen wurden Aliquots entnommen und unter dem Mikroskop die Anzahl der Tetraden in einer Thomakammer aufgrund morphologischer Kriterien ausgezählt.

Für Tetradenanalysen wurden Einzelklone der Präsporulationsplatten auf Sporulationsplatten (1 % K-Acetat, 0.1 % Bacto Yeast Extrakt, 0.05 % Dextrose, 2 % Bacto Agar) dick ausgestrichen.

6.4 Tetradenanalysen (Sherman, 1975)

In dieser Arbeit wurden Tetradenanalysen ausschließlich dazu benutzt, um zu testen, ob alle vier gebildeten Sporen lebensfähig sind und auskeimen können. Es war deshalb nicht notwendig eine große Zahl von Asci zu analysieren.

Die zu untersuchenden haploiden Hefen (*a*, *leu2*, *trp1*) wurden wie oben beschrieben mit dem Testerstamm III C (α , *arg*, *thr*) konjugiert und auf Minimalplatten (67 % Difco Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 2 % Dextrose, 2 % Bacto Agar) selektioniert. Verschiedene diploide Hefezellen wurden ausgewählt und wie oben beschrieben auf Präsporulations- und später auf Sporulationsplatten überimpft. Die Sporulationsplatten wurden 2 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert und der Grad der Ascibildung unter dem Mikroskop verfolgt. Sobald genügend Asci gebildet waren, wurden mit einer sterilen Impföse ein Teil der Hefezellen von der Platte abgekratzt, in 100 ml TE suspendiert und mit 10 - 50 μ l Glusulase versetzt. Die Hefesuspension wurde bei 30 °C leicht bewegt und der Zustand der Asci alle 5 Min im Mikroskop überprüft. Sobald der kompakte Zustand der Tetraden relaxiert war, wurde mit der sterilen Impföse ein Teil der Suspension auf eine dünne YPD-Platte in der Form eines großen Quadrates ausgestrichen. Die Platte wurde umgedreht auf dem Objektisch des Mikroskops fixiert und eine Stelle mit isoliert liegenden Asci gesucht. Mit einem hydraulischen Mikromanipulator wurde nun ein Ascus nach dem anderen in seine vier Sporen zerlegt und die vier Sporen separat an bestimmten Orten auf der Agarplatte plaziert.

Das Zerlegen und Transportieren der Asci bzw. Sporen auf der Agarplatte erfolgte mit einer sehr dünn ausgezogenen Glasnadel, die senkrecht nach oben gerichtet an den mit dem Mikromanipulator verbundenen Glasstab geklebt war.

Die Platten wurden anschließend 3 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert und die ausgekeimten Tochterklone weiter analysiert.

6.5 Fällung von Nukleinsäuren (Maniatis et al., 1982)

Durch Zusatz von Ethanol zu wässrigen Nukleinsäurelösungen wird deren Löslichkeitsprodukt reduziert, und sie fallen aus.

Normalerweise wurden größere Mengen (> 1 mg) an DNA durch Zusatz von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 2 Volumen eiskaltem Ethanol für 10 Min auf Trockeneis präzipitiert. Daran schloß sich eine Zentrifugation in der Eppendorfzentrifuge (10 Min, 0 °C, 12 000 UpM) an. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgezogen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut kurz zentrifugiert, das Ethanol abgezogen, das Präzipitat im Vakuum getrocknet und in TE gelöst.

Bei Fällungen von Nukleinsäuremengen < 1 mg wurde die Präzipitation bei -70 °C und für mehrere Stunden bis über Nacht durchgeführt. Die Fällung wurde anschließend auch länger (15 Min.) zentrifugiert. Größere Mengen an Nukleinsäuren (> 1 mg) in einem größeren wässrigen Volumen (> 1 ml) wurden nach der gleichen Prozedur, jedoch mit entsprechend größeren Volumina in 30 ml Corex Glasröhrchen und die Zentrifugation in der Heraeus Christ Minifuge GL (15 Min, 4 °C, 8 000 UpM) bzw. in der Sorvall Zentrifuge im HB4 Rotor (15 Min, 4 °C, 8 000 UpM) durchgeführt.

Isopropanolfällungen von DNA wurden mit 1 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5.2) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Sehr kleine DNA-Fragmente (Oligodeoxynukleotide) wurden in Anwesenheit von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 1/10 Volumen 100 mM MgCl₂ mit 2.5 Volumen Ethanol gefällt.

RNA wurde wie DNA in Gegenwart von Na-Acetat, pH 5.2 (Endkonz.: 300 mM), jedoch mit 3 Volumen Ethanol präzipitiert.

6.6 Phenolextraktion von Nukleinsäuren (Maniatis et al., 1982)

Sowohl wässrige DNA- als auch RNA-Lösungen, können durch Extraktion mit Chloropane (Mischung aus Phenol und Chloroform) von Proteinen gereinigt werden.

Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit Na-Acetat (pH 5.2) versetzt (Endkonz.: 300 mM) und mit 1 Volumen Chloropane extrahiert. Durch Zentrifugation (Eppendorftischzentrifuge,

RT, 5 Min, 12 000 UpM oder, falls die Extraktion in 50 ml Plastikröhrchen durchgeführt wurde, in der Heraeus Christ Minifuge GL, RT, 5 Min, 6 000 UpM) wurden die Phasen getrennt und die untere organische Phase abgenommen. Die Extraktion und Zentrifugation wurde anschließend mit einem Gemisch aus Chloroform/Isoamylalkohol (24 / 1) wiederholt. Die wässrige Phase wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Ethanol gefällt.

6.7 Reinigung von Oligodeoxynukleotiden

Die Ausbeute bei der maschinellen Synthese von Oligodeoxynukleotiden ist nicht 100 %. Das heißt es entstehen auch kürzere DNA-Oligonukleotide von der Länge $n - 1$ und kleiner. Diese Verunreinigungen sollen möglichst von dem gewünschten Oligodeoxynukleotid der Länge n abgetrennt werden. Dies kann durch eine präparative Gelelektrophorese erreicht werden.

Das lyophilisierte Oligodeoxynukleotid wurde in 50 μ l TE gelöst und mit 50 μ l Formamidaufragspuffer versetzt. Je nach Ausbeute der Synthese wurde ein 5 - 50 μ l Aliquot auf ein 3 mm dickes 16 % Polyacrylamid / 8 M Harnstoffgel (gilt für DNA-Oligonukleotide einer Länge von 10-40 Nukleotide) aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei RT für 2 Std bei einer Spannung von 800 V und einer Stromstärke von 20 mA durchgeführt.

Die Oligodeoxynukleotidbande konnte im Gel durch UV-Licht-Löschung (254 nm) detektiert und ausgeschnitten werden.

Durch einfache Diffusion wurde das Oligodeoxynukleotid aus dem mechanisch zerkleinerten Gelstück eluiert, indem man etwa 500 μ l TE mit den Gelstückchen mischte und über Nacht bei RT schüttelte.

Durch Zentrifugation durch silikonisierte Glaswatte in der Eppendorftischzentrifuge bei 2 000 UpM wurden eventuell vorhandene Polyacrylamidstückchen von der wässrigen Phase abgetrennt und mit 500 μ l TE nachgewaschen. Die wässrige Phase wurde dann durch mehrere Extraktionen mit je 1 Volumen n -Butanol bis auf etwa 300 μ l eingeengt.

An die Butanolextraktion schloß sich eine Extraktion mit 1 Volumen Äther an. Reste von Äther wurden vor der anschließenden Ethanol-fällung abgedampft, indem der Ansatz für 10 Min bei 65 °C inkubiert wurde. Das Oligodeoxynukleotid wurde in 300 μ l TE gelöst, in der Eppendorftischzentrifuge abzentrifugiert (2 Min, RT, 12 000 UpM) und der Überstand in einem neuen Eppendorfreaktionsgefäß nochmals mit Ethanol gefällt und schließlich zu einer Konzentration von 100 ng/ μ l gelöst.

6.8 Gelelektrophorese

6.8.1 Agarosegele (Maniatis et al., 1982)

Auf 0.8 - 1.2 %igen Agarosegelen wurden 200 bp - 23 000 bp lange DNA-Fragmente für analytische und präparative Zwecke aufgetrennt.

Für ein x %iges Agarosegel wurden x g Agarose abgewogen, 100 ml 1 x TBE zugegeben und im Mikrowellenherd 5 Min gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war.

Die Gellösung wurde auf 50 °C abgekühlt, 10 µl 1 % EtBr-Lösung zugesetzt und horizontale Gelwannen mit Geltaschenformer ca. 0.5 cm hoch gefüllt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/6 Volumen Auftragspuffer III (30 % Glycerin, 0.25 % XC, 0.25 % BPB) versetzt, aufgetragen und bei 5 V/cm elektrophoretisiert.

Das in basengepaarte Nukleinsäuren interkalierende EtBr konnte im UV-Durchlicht (254 nm) sichtbar gemacht werden und durch einen Rotfilter, bei Blende 8, Belichtungszeit 1 Sec und 27 DIN Filmempfindlichkeit fotografiert werden.

1 x TBE (pH 8.0): 89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

6.8.2 "Low Melting Point"-Agarosegele

Sollten DNA-Fragmente für Ligationen in LMP-Agarose aufgetrennt werden so wurde ein 0.8 %iges LMP-Agarosegel präpariert. Bis auf zwei Abweichungen wurde es genau so, wie es für Agarosegele oben beschrieben ist, hergestellt. Erstens wurde nur die Hälfte an EtBr also 1/20 000 Volumen 1 % EtBr-Lösung zugesetzt, und zweitens erfolgte die Elektrophorese bei 4 °C im Kühlraum.

6.8.3 Agarosegele zum Auftrennen von RNA (Gordon und McMaster, 1980)

5 µg Poly(A)⁺RNA oder 30 µg Gesamt-RNA in 10 µl Wasser wurden mit 20 µl Glyoxalmix (73 % DMSO, 8.5 % Glyoxal*, 0.3 % SDS, 15 mM Na-Phosphat, pH 6.5) 15 Min bei 50 °C behandelt. Radioaktiv markierte doppelsträngige DNA-Längenstandards wurden genauso behandelt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf ein 1.2 %iges Agarosegel (in 10 mM Na-Phosphat Puffer +, ohne EtBr) mit 1 µl 1 %iger BPB-Lösung vermischt. Als Laufpuffer verwendete man 10 mM Na-Phosphat (pH 6.5), der aufgrund der geringen Pufferkapazität während der Elektrophorese (3 - 5 Std bei 5 V/cm) ständig umgumpft wurde.

* 40 % Glyoxal (Kodak) wurde jedesmal vor dem Gebrauch 10 Min mit Biorad, Analytical Grade Mixed Bed Resin AG 501-X8(D) 20 - 50 mesh, behandelt.

+ Na-Phosphat Puffer (pH 6.5): 0.5 M Na_2HPO_4 : 0.5 M NaH_2PO_4 = 1 : 1

6.8.4 Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoffgele

A) Sequenzgelelektrophorese

Sämtliche Nukleinsäuresequenzanalysen wurden mit $\alpha[^{35}\text{S}]$ -dATP durchgeführt und die Glasplatten der Sequenzgele wurden so vorbehandelt, daß das Gel später auf einer Platte getrocknet werden konnte.

Vorbereitung der Glasplatten

1) Siliconisieren der "Ohrenplatte": Die absolut saubere Ohrenplatte wurde im Abzug mit 5 ml 5 % (V/V) Dimethyldichlorsilan in Chloroform eingerieben, getrocknet und mit 70 % Ethanol poliert.

2) Silanisieren der zweiten Glasplatte: Ebenfalls unter dem Abzug wurde die saubere Platte mit der "Bindesilan"-Lösung (6.5 ml Ethanol, 190 μl 10 % Essigsäure, 19 μl γ -Methacryloxypropyl-Trimethylsilan) eingerieben, getrocknet und mit 70 % Ethanol poliert. Die Glasplatten (50 cm x 20 cm) wurden, durch 0.15 mm dickes Spacermaterial und den Geltaschenformer getrennt, zusammengeklammert.

Gießen der Gele

40 ml einer 6 % Acrylamid / 7 M Harnstofflösung (Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid = 19 : 1) wurden mit 40 μl TEMED und 200 μl 10 % APS gemischt und zwischen die an drei Seiten abdichteten Glasplatten gegossen.

Nach etwa 2 Std war das Gel durchpolymerisiert und konnte für Sequenzanalysen verwendet werden.

Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde in 1 x TBE als Laufpuffer und bei 40 - 45 Watt durchgeführt. Um die dabei entstehende Hitze gleichmäßig über das gesamte Gel zu verteilen, wurde auf eine Seite des Gels zusätzlich eine 0.5 cm dicke Aluminiumplatte befestigt. Das Gel wurde mindestens 30 Min vorelektrophoretisiert und unmittelbar vor dem Auftragen der Proben wurden die Geltaschen mit 1 x TBE ausgespült, um den aus dem Gel diffundierten Harnstoff zu entfernen.

Fixieren der DNA im Gel

Nach der Gelelektrophorese wurden die Glasplatten getrennt und die Glasplatte mit dem daran haftenden Gel 10 Min in 10 % Essigsäure und dann 10 Min in Wasser gelegt. Das

fixierte Polyacrylamidgel wurde schließlich mit dem Heißluftfön auf der Glasplatte getrocknet und bei RT autoradiographiert.

B) Polyacrylamid-Harnstoffgele für Primer-Extensions Analysen

Primer-Extensions Analysen wurden generell mit [^{32}P]-endmarkierten Proben durchgeführt. Die Vorbehandlungen der Glasplatten (40 cm x 20 cm), wie sie für Sequenzanalysen notwendig sind, entfiel, da die Polyacrylamidgele für Primer-Extensions Analysen nicht auf den Glasplatten fixiert wurden. Außerdem wurde dickeres Spacermaterial (0.33 mm) und andere Acrylamid und Harnstoffkonzentrationen (12 % Polyacrylamid, 8 M Harnstoff) verwendet. Die erforderliche Acrylamidkonzentration wurde durch entsprechende Mischung von zwei Stammlösungen (A: 5 % Acrylamid / 8 M Harnstoff; B: 20 % Acrylamid / 8 M Harnstoff) erzeugt. Die eigentliche Präparation des Gels und die Elektrophorese waren identisch zur Sequenzgelanalyse. Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten getrennt und die Glasplatte mit dem Gel in Frischhaltefolie eingepackt und bei -70 °C autoradiographiert.

6.8.5 Native Polyacrylamid-Agarosegele

Dieses native Gelsystem wurde zur Charakterisierung von Spleißkomplexen verwendet. Die Gele wurden nach einem Protokoll von K. Hartmut (persönliche Mitteilung) gefertigt:

0.5 g Agarose, 5 ml 10 x TBE, 87 ml H₂O wurden autoklaviert, auf 50 °C abgekühlt und mit 7.5 ml einer Acrylamid / Bisacrylamid (159 / 1) Lösung unter Schwenken gemischt. Weiterhin wurden 250 µl 10 % APS und 25 µl TEMED zugesetzt. Die noch warme Gellösung wurde dann unter Vermeidung von Luftblasen in die abgedichtete Kammer (25 cm x 20 cm x 0.15 cm) gegossen und sofort der Geltaschenformer eingesetzt.

Die Gelelektrophorese wurde bei 4 °C, einer Spannung von 100 Volt und mit 0.5 x TBE als Laufpuffer durchgeführt.

6.9 Plasmidpräparationen aus *E. coli*

6.9.1 Plasmidpräparation aus 200 ml Kulturen

Die Lyse der Bakterien wurde etwas modifiziert nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt.

200 ml LB-Medium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, Ampicillin (100 µg/ml) oder Chloramphenicol (25 µg/ml), wurde mit einer Einzelkolonie oder 100 µl einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei guter Belüftung im 1 l Erlenmeyerkolben

geschüttelt. Es konnten somit nur die Bakterien wachsen, die ein Plasmid mit dem entsprechenden Antibiotikaresistenzgen trugen.

Die stationäre Kultur wurde am nächsten Tag abzentrifugiert (Sorvall RC 5, GSA Rotor, 10 Min, 4 °C, 6 000 UpM) und das Sediment in Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mg/ml Lysozym) suspendiert. Das Lysozym wurde dabei frisch gelöst. Die Bakteriensuspension wurde in ein SS34 Polpropylen Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Min bei RT stengelassen, bevor 8 ml frisch angesetzte Lösung II (0.2 M NaOH, 1 % SDS) zugegeben wurde. Anschließend wurde vorsichtig gemischt und weitere 10 Min im Eis inkubiert. Danach wurden 6 ml 5 M K-Acetat-Lösung (pH 5.0) zugegeben, 5mal kräftig geschüttelt und erneut 10 Min auf Eis inkubiert. Die lysierten Bakterien wurden abzentrifugiert (Sorvall RC 5, SS34 Rotor, 30 Min, 4 °C, 19 000 UpM) und der Überstand mit Chloropane extrahiert (vgl. Extraktion mit Chloropane). Die wässrige Phase mit den Nukleinsäuren wurde mit Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, das Sediment getrocknet und in 1.5 ml TE gelöst. Zur DNA-Lösung gab man dann 1.85 g CsCl, 120 µl EtBr (1 %ige Lösung), bevor man TLF 100 Beckman Quickseal Zentrifugenröhrchen damit füllte und dicht verschweißte.

Die CsCl-Gleichgewichtszentrifugation wurde für 3 Std bei 100 000 UpM in der Beckman Miniultrazentrifuge im TLV 100 Rotor bei 20 °C durchgeführt. Danach wurde die Plasmidbande mit einer Kanüle abgezogen und 3- bis 4mal mit CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Die nun EtBr-freie wässrige Phase wurde in ein 15 ml Corex Glaszentrifugenröhrchen überführt und mit 2 Volumen Wasser verdünnt. Die folgende Ethanolfällung wurde ohne Zugabe von Salz mit 2.5 Volumen Ethanol bei 4 °C für 15 Min durchgeführt. Nach der Zentrifugation (Heraeus Christ Minifuge GL, 15 Min, 4 °C, 6 000 UpM) wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in TE gelöst und im Eppendorfreaktionsgefäß nochmals mit Ethanol gefällt. Die Konzentration der DNA wurde im Photometer bei OD₂₆₀ bestimmt (OD₂₆₀ = 1 entspricht 40 µg/ml DNA) und auf 1 mg/ml eingestellt.

6.9.2 Plasmidpräparation aus 1.5 ml Kulturen

Die Lyse der Bakterien wurde in diesem Fall durch Kochen erreicht. Es handelte sich um ein modifiziertes Protokoll der "Boiling Methode" nach Wilimzig (1985).

1.5 ml Übernachtskulturen wurden abzentrifugiert (Eppendorftischzentrifuge, RT, 15 Sek) und das Medium quantitativ abgenommen. Das verbleibende Sediment wurde in 250 µl Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 62.5 mM EDTA, 0.4 % Triton X100, 2 M LiCl) mit Hilfe des Vortex suspendiert und 5 Min im Eis stengelassen. Dann setzte man 25 µl frische Lysozymlösung (10 mg/ml) zu, mischte gut, stellte das Eppendorfreaktionsgefäß genau für 1 Min in kochendes Wasser und dann sofort für 5 Min in Eis. Nach der anschließenden

Zentrifugation (Eppendorftischzentrifuge, RT, 15 Min, 12 000 UpM) wurde das schleimige Pellet mit einer Pipettenspitze entfernt und der Überstand mit Chloropane extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann mit Ethanol bei RT gefällt und in 50 µl TE gelöst. 5 µl davon konnten für Restriktionsanalysen, bei gleichzeitiger RNase A Behandlung (Endkonz.: 0.05 µg/µl), verwendet werden.

6.10 Präparation von M13 Einzel- und Doppelstrang-DNA (Messing, 1983)

Werden *E. coli* JM109 oder JM101 Zellen mit M13 Phagen infiziert, so kommt es während der ersten Stunden zu einer starken Phagenvermehrung in den *E. coli* Zellen, wobei die Phagen-DNA in der replikativen, also doppelsträngigen Form (RF) vorliegt. In einer späteren Phase, in der die meisten *E. coli* Zellen bereits mit M13 Phagen infiziert sind, dominieren die extrazellulären M13 Phagenpartikel. Die mit einer Proteinhülle umschlossenen M13 Phagen besitzen einzelsträngige DNA und befinden sich im Zellüberstand.

Um beides, M13 Einzel- und Doppelstrang-DNA, aus einer Kultur gleichzeitig isolieren zu können, wurde eine mit M13 Phagen infizierte *E. coli* Kultur aufgearbeitet, die sich in einer späten logarithmischen Wachstumsphase befand. Dazu wurde eine 10 ml logarithmisch wachsende JM109 oder JM101 Kultur in NZ-Medium (OD₆₀₀ = 0.3) mit 100 µl M13 Phagensuspension ($\approx 10^8$ Phagen) infiziert und 5 Std bei 37 °C geschüttelt. 3 ml dieser Kultur wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß sedimentiert (Eppendorftischzentrifuge, 5 Min, RT, 12 000 UpM) und aus dem Präzipitat doppelsträngige M13-DNA isoliert. Hierzu wurde die Standardmethode zur Plasmidpräparation aus 1.5 ml verwendet.

Je nachdem wieviel einzelsträngige DNA man benötigte, wurden 1 oder 10 ml des Kulturüberstandes aufgearbeitet. Die folgenden Angaben beziehen sich auf 1 ml Überstand. Der Zellüberstand aus 1.5 ml Kultur wurde ein zweites Mal abzentrifugiert (Eppendorftischzentrifuge, 10 Min, RT, 12 000 UpM), 1 ml Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 200 µl einer Lösung aus 20 % PEG 6 000 und 2.5 M NaCl gut gemischt.

Bevor die M13 Phagen abzentrifugiert (Eppendorftischzentrifuge, 15 Min, RT, 12 000 UpM) werden konnten, wurde der Ansatz 10 Min bei RT und 10 Min auf Eis stehengelassen. Der Überstand wurde abpipettiert und nach erneuter Zentrifugation (5 Min) quantitativ entfernt. Das Präzipitat wurde in 90 µl TE suspendiert, mit 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 5) versetzt und mit Chloropane extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Ethanol gefällt, gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE gelöst. Die Ausbeuten lagen bei etwa 10 - 20 µg ssDNA.

6.11 Präparation von einzelsträngiger pM(a/c)-DNA

Rekombinante pM(a/c)-Plasmide wurden in *E. coli* WK6 Zellen transformiert und die für "gapped duplex DNA" Mutagenese notwendige ssDNA nach einem Protokoll von Pharmacia präpariert. Die dafür notwendigen Helferphagen M13K07 wurden von Pharmacia bezogen. Die mit den rekombinanten pM(a/c)-Plasmiden transformierten WK6 Zellen wurden in 2 x YT bis zu einer $OD_{600} = 0.5 - 0.8$ unter Selektionsbedingungen herangezogen. 2 ml davon wurden dann mit M13K07 Helferphagen (10 pfu pro Bakterienzelle) infiziert und bei 37 °C heftig geschüttelt. Nach 1 Std wurden schließlich 10 ml frisches 2 x YT-Medium mit 400 µl der infizierten Zellen versetzt, Kanamycin zugegeben (Endkonz.: 70 µg/ml), und bei 37 °C geschüttelt. Nach 15 - 18 Std wurde dann die Kultur abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 15 Min, 4 °C, 6 000 UpM), der Überstand erneut zentrifugiert, und von diesem Überstand schließlich ssDNA isoliert. Die Vorgehensweise war dabei die gleiche wie zur Isolierung von einzelsträngiger M13-DNA.

6.12 Isolierung genomischer Hefe-DNA (Sherman, et al., 1983)

Mit dieser Methode kann nicht nur genomische Hefe-DNA, sondern auch Plasmid-DNA aus Hefe isoliert werden. In der Regel genügte es, die Zellen aus einer 50 ml Hefekultur mit einer $OD_{600} = 2$ aufzuschließen, um mehrere Milligramm genomischer DNA zu isolieren.

Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 5 Min, RT, 6 000 UpM), in 3 ml 0.9 M Sorbit, 0.1 M EDTA (pH 7.5) suspendiert, mit 100 µl Zymolyase 100 000 (2.5 mg/ml) versetzt und 30 Min bei 37 °C bewegt. Dann gab man nochmals 100 µl Zymolyase zu, inkubierte weitere 30 Min, bevor die Zellen wieder abzentrifugiert und in 5 ml Tris-HCl, 20 mM EDTA (pH 7.4) suspendiert und in SS34 Polypropylen Zentrifugenröhrchen überführt wurden.

Zur Suspension gab man dann 0.5 ml SDS (10 %) und inkubierte 30 Min bei 65 °C, bevor 1.5 ml K-Acetat zugesetzt und der Ansatz 60 Min im Eis stehengelassen wurde. Die lysierten Zellen zentrifugierte man ab (Sorvall RC5, SS34 Rotor, 4 °C, 10 Min, 10 000 UpM), überführte den Überstand in 30 ml Corex Glaszentrifugenröhrchen und fällte die DNA mit 2 Volumen Ethanol ohne Zusatz von Salz für 15 Min bei RT. Nach der Zentrifugation (Heraeus Christ Minifuge GL, 10 Min, RT, 6 000 UpM) wurde das Präzipitat in 3 ml TE gelöst, mit 10 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und 1 Std bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß daran wurden unlösliche Partikel durch Zentrifugation (Heraeus Christ Minifuge GL, 5 Min, RT, 6 000 UpM) abgetrennt, der klare Überstand in 15 ml Corex Glaszentrifugenröhrchen überführt und mit 1 Volumen Isopropanol überschichtet. Durch Schwenken oder durch Rühren mit einer Pasteurpipette wurde die chromosomale DNA an der Grenzschicht zu einem "Cocon" aufgewickelt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Sollte

hauptsächlich Plasmid-DNA isoliert werden, so wurde die DNA als Nukleinsäuregemisch (RNA, Plasmid-DNA, genomische DNA, mitochondriale DNA) mit Ethanol präzipitiert. Die DNA wurde in 300 µl TE gelöst, nochmals mit Ethanol gefällt, wieder in TE gelöst und in diesem Zustand für Restriktionsspaltungen verwendet.

6.13 Isolierung von Hefe-RNA nach der "Hot-Phenol-Methode" (Domdey et al., 1984)

Die Methode der RNA Isolierung mit heißem Phenol beruht darauf, daß bei pH 5 und niedrigen Salzbedingungen, dsDNA und Proteine in der organischen Phase akkumulieren, während sich RNA hauptsächlich in der wässrigen Phase wiederfindet. Mit dieser Methode können auch Hefesporen und sehr dicht gewachsene Hefekulturen ($OD_{600} > 10$) aufgeschlossen und daraus RNA isoliert werden. Normalerweise wurde jedoch aus Kulturen, die sich in der frühen logarithmischen Phase befanden, RNA isoliert.

Dazu wurde eine 100 ml Übernachtkultur ($OD_{600} = 2 - 4$) mit 1 Volumen frischem Vollmedium verdünnt und weitere 1 - 2 Generation bei 30 °C geschüttelt. Die Hefezellen wurden dann durch Zentrifugation (Heraeus Christ Minifuge GL, 5 Min, RT, 5 000 UpM) sedimentiert und in 10 ml Na-Acetat-Puffer, pH 5.0 (50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA) suspendiert. Nach Zusatz von 1 ml SDS (10 %) gab man sofort 12 ml "Hot-Phenol" (65 °C heißes Phenol mit Na-Acetat-Puffer, pH 5.0, äquilibriert) zu und extrahierte für 4 Min durch heftiges Schütteln im 65 °C Wasserbad. Danach wurde der Ansatz schnell im Ethanol/Trockeneisbad abgekühlt und durch Zentrifugation (Heraeus Christ Minifuge GL, 10 Min, RT, 5 000 UpM) die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase mit Interphase erneut mit 12 ml "Hot-Phenol" extrahiert (siehe oben). Nach der Phasentrennung wurde dann die wässrige Phase in einem neuen 50 ml Plastikröhrchen mit Chloropane extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde in Wasser gelöst, in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und nochmals mit Ethanol gefällt, bevor sie für weitere Analysen (Northernblot, Primer-Extension) verwendet wurde.

6.14 Anreicherung von Poly(A)+RNA (Domdey et al., 1984)

Durch spezifische Bindung von Poly(A)+RNA an Oligo(dT)-Cellulose kann Poly(A)+RNA angereichert werden, indem die Poly(A)-RNA gewaschen wird.

10 ml Glassäulen mit Fritten (Biorad) wurden mit 1 ml suspensierter Oligo(dT)-Cellulose gefüllt, das Säulenmaterial zuerst mit 10 ml NaOH (0.1 M) und dann mit 20 ml Wasser gewaschen, bevor die Säule mit 50 ml HSB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 % SDS, 5 mM EDTA, 0.5 M NaCl) äquilibriert wurde. Die Gesamt-RNA wurde in 2.5 Volumen ELU-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 % SDS, 1 mM EDTA) aufgenommen, 3 Min bei

65 °C erhitzt, auf RT abgekühlt und mit 5 M NaCl auf 0.5 M NaCl Endkonzentration gebracht. Diese Lösung wurde mit einer Flußrate von 1 Tropfen pro 5 Sek über die Säule gegeben, der Durchfluß aufgefangen und nochmals auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde dann mit 50 - 100 ml HSB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 % SDS, 1 mM EDTA) gewaschen und die Poly(A)+-Fraktion mit 2 x 4 ml ELU-Puffer eluiert und mit Ethanol gefällt. Bevor die gelöste Poly(A)+RNA für weitere Analysen verwendet wurde, wurde sie noch mindestens einmal mit Ethanol gefällt.

6.15 Restriktionsspaltungen (Maniatis et al., 1982)

Zur Analyse und Identifizierung von doppelsträngiger DNA kann diese mit Restriktionsendonukleasen in definierte Bruchstücke zerlegt werden, die dann nach Gelelektrophorese in Anwesenheit von EtBr im UV-Licht sichtbar gemacht werden können. Für analytische Spaltungen von DNA und der anschließenden Auftrennung in Agarosegelen benötigt man etwa 1 µg dsDNA. Um auch sehr kleine Fragmente auf nativen Polyacrylamidgelen identifizieren zu können, braucht man etwa 5 µg DNA.

Restriktionsspaltungen für solche analytischen Zwecke wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt, die normalerweise folgendermaßen zusammengesetzt waren: 1 - 5 µg DNA, 2 µl des 10fach konzentrierten Puffers (je nach Enzym Niedrig-, Mittel- oder Hochsalzpuffer), die entsprechenden Restriktionsenzyme und Wasser.

Restriktionsspaltungen mit mehreren Enzymen, die unterschiedliche Salzkonzentrationen benötigten, wurden schrittweise von Niedrigsalz- nach Hochsalzbedingungen durchgeführt. Nur bei sehr gut schneidenden Restriktionsenzymen wie EcoRI, HindIII, BamHI wurde ein Universalrestriktionspuffer (URP) benutzt und mit mehreren Enzymen gleichzeitig gespalten. Für das Restriktionsenzym SmaI wurde stets der dafür vorgesehene SmaI-Restriktionspuffer benutzt.

Quantitative Spaltungen von Plasmid-DNA oder genomischer DNA (bis zu 30 µg) wurden in einem Volumen von 90 µl durchgeführt. Nach dem Verdau wurde das Reaktionsgemisch mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt, bevor es durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurde.

10 x Niedrigsalzpuffer:

100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

10 x Mittelhoher Salzpuffer:

500 mM NaCl
100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

10 x Hochsalzpuffer:

1000 mM NaCl
 500 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 100 mM MgCl₂
 10 mM DTT

10 x SmaI-Puffer:

200 mM KCl
 100 mM Tris-HCl (pH 8)
 100 mM MgCl₂
 10 mM DTT

10 x Erhöhungspuffer von Niedrig- auf Hochsalzbedingungen:

1000 mM NaCl
 400 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 x Erhöhungspuffer von Mittelhoch- auf Hochsalzbedingungen:

500 mM NaCl
 400 mM Tris-HCl (pH 7.5)

6.16 Isolierung doppelsträngiger DNA-Fragmente

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden für die Ligation mit anderen DNA-Fragmenten, für radioaktive Markierungen und für die Transformation von Hefezellen aus Agarosegelen isoliert.

Dazu wurde in allen Fällen die EtBr-gefärbte DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in der Elektroelutionskammer von Schleicher & Schüll, je nach Fragmentgröße unterschiedlich lang (1 - 6 Std), bei 200 Volt (Elektrodenabstand 30 cm) in 1 x TBE-Puffer eluiert. Bevor das Eluat (200 - 400 µl) entnommen wurde, wurde die Stromrichtung für 10 Sek umgekehrt, damit das an der Membran adsorbierte Material wieder frei vorlag. Das Eluat wurde mit Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und in TE aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde durch Vergleich mit anderen bekannten DNA-Konzentrationen im Agarosegel bestimmt. Die isolierten Fragmente wurden bei -20 °C gelagert.

6.17 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase (Ausubel et al., 1987)

Bei Ligation von zwei DNA-Fragmenten ist die intramolekulare Ligation der einzelnen Fragmente unerwünscht, deshalb entfernt man häufig am Vektor die 5' Phosphatreste durch das Enzym alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). Um 1 pMol 5' Enden (1.6 µg bei einem 4 Kbp Fragment) in 50 µl zu dephosphorylieren, benötigt man 0.01 U CIP und

folgende Salz- bzw. pH-Bedingungen: 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $ZnCl_2$, 1 mM Spermidin.

Die Reaktion wurde bei überhängenden Enden bei 37 °C für 30 Min und nach erneuter Zugabe von CIP weitere 30 Min bei 37 °C inkubiert.

Die Dephosphorylierung glatter Enden wurde 15 Min bei 37 °C und 15 Min bei 56 °C durchgeführt. Nach erneuter Zugabe von CIP wurde die Inkubationsfolge wiederholt.

Die Inaktivierung von CIP erfolgte nach Zusatz von 40 μ l H_2O , 10 μ l 10 x STE (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 M NaCl, 10 mM EDTA) und 5 μ l SDS (10 %) durch Erhitzen für 15 Min auf 68 °C, und anschließendes mehrmaliges Extrahieren mit Chloroform. Die mit Ethanol gefällten und in TE gelösten DNA-Fragmente konnten dann für 5' Markierungen und Ligationen verwendet werden.

6.18 Ligation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten (Maniatis et al., 1982)

DNA Fragmente mit passenden überhängenden, oder glatten Enden können durch T4 DNA Ligase verknüpft werden. Ligationsansätze zur Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3' Hydroxy- und 5' Phosphatgruppen enthielten 100 - 500 ng DNA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μ g/ml BSA und 100 U T4 DNA Ligase (Biolabs).

6.18.1 Ligation von isolierten Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden wurde in einem Volumen von 25 μ l durchgeführt, wobei 100 ng Vektor-DNA und ein 3fach molarer Überschuß an zu inserierender DNA eingesetzt wurde.

DNA Fragmente mit glatten Enden wurden in einem Volumen von 15 μ l ligiert. An Vektor-DNA wurden ca. 50 ng eingesetzt und zu inserierende DNA-Fragmente in einem 5fach molaren Überschuß zugesetzt. Alle Ligationen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei 12 °C über Nacht im Wasserbad.

Für anschließende Transformationen wurde jeweils der halbe Ligationsansatz verwendet.

6.18.2 Ligation in "Low Melting Point"-Agarosegelen

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten, die in LMP-Agarose vorlagen, war es sehr wichtig, den Anteil an LMP-Agarose im Ligationsansatz möglichst niedrig zu halten, um gute Ligationseffizienzen zu bekommen. Deshalb wurden die EtBr-gefärbten DNA-Banden sehr knapp ausgeschnitten, so daß in der Regel etwa 300 ng DNA in 10 µl LMP-Agarose enthalten waren. Dazu gab man 2 Volumen Wasser, schmolz die LMP-Agarose bei 65 °C für 10 Min auf und inkubierte weitere 5 Min bei 37 °C. Bei 37 °C wurde dann auch der Ligationsansatz zusammen pipettiert und sorgfältig gemischt. Die Puffer-, Salz- und DNA-Konzentrationen waren die gleichen wie bei der Ligation von isolierten DNA-Fragmenten, nur daß die Ligation für Fragmente in LMP-Agarose bei RT durchgeführt wurde, und daß in allen Fällen nach 20 Min eine Volumenerhöhung von 25 auf 75 µl erfolgte. Nach 3 Std wurde nochmals Ligase zugegeben und weitere 3 Std bei RT inkubiert. 20 µl davon wurden für die Transformation in *E. coli* Stämme verwendet.

(DNA-Fragmente in LMP-Agarose konnten ohne weiteres bei -20 °C gelagert und mehrmals wieder erfolgreich für Ligationen verwendet werden.)

6.18.3 "shotgun"-Ligationen

Einfache Umklonierungen von einem Vektor in einen anderen, oder einfache Subklonierungen von Restriktionsfragmenten in den gleichen Vektor wurden meistens so durchgeführt, daß keine DNA-Fragmente isoliert wurden, sondern die vereinigte(n) DNA(s) in einem Gefäß mit Restriktionsenzymen verdaut wurde(n). Nach Extraktion mit Chloroform und Fällen mit Ethanol (siehe oben) wurde ligiert und in *E. coli* Stämme transformiert.

Die Selektion auf den richtigen Klon erfolgte in diesen Fällen meistens durch Induktion mit IPTG und Selektion auf X-Gal-haltigen Agarplatten, und / oder Koloniehybridisierungen mit anschließender Plasmidminipräparation und analytischem Restriktionsverdau.

6.19 Transformationsmethoden

6.19.1 Transformation von *E. coli* K12 Stämmen (Hanahan, 1983)

Für die Erzeugung transformationskompetenter *E. coli* Zellen gibt es mehrere Möglichkeiten. Die CaCl₂-Methode ist sehr einfach und schnell, liefert jedoch nur durchschnittliche Transformationseffizienzen (Morrison, 1979). Deshalb wurden alle in dieser Arbeit benutzten *E. coli* Stämme nach der Methode von D. Hanahan (1983) kompetent gemacht. Die Transformationseffizienzen variierten von 10⁶ - 10⁷ Transformanten pro µg DNA bei

"eingefrorenen" Zellen und von 10^7 - 10^8 Transformanden pro μg DNA bei "frischen" Zellen.

Stationäre Übernachtskulturen in NZ-Medium wurden 1:50 mit frischen NZ-Medium verdünnt und bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0.3 - 0.5$ weiter inkubiert. Dann wurden die Zellen in 30 ml Corex Glasröhrchen sedimentiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 10 Min, 4°C , 3 800 UpM), in 1/3 Volumen TFB-Puffer suspendiert (einzufrierende Zellen wurden im FSB-Puffer aufgenommen) und 10 Min im Eis stengelassen und erneut abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 10 Min, 4°C , 3 800 UpM). Das Zellpellet wurde nun sehr vorsichtig, immer auf Eis, in 1/20 des Ausgangsvolumen TFB- bzw. FSB-Puffer aufgenommen und 200 μl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße überführt.

Dann wurde pro 200 μl Ansatz 7 μl DMSO zugesetzt, 5 Min im Eis inkubiert, 7 μl DTT-Stammlösung zugesetzt, 10 Min im Eis inkubiert, nochmals 7 μl DMSO zugegeben und weitere 5 Min im Eis stengelassen, bevor DNA zupipettiert wurde. Bei einzufrierenden Zellen wurde keine DTT-Stammlösung zugesetzt, sondern zweimal DMSO. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C über mehrere Monate gelagert ohne drastisch an Transformationseffizienz zu verlieren.

Meistens wurde der halbe Ligationsansatz, jedoch nicht mehr als 20 μl des Ligationsansatzes pro 200 μl kompetente *E. coli* Zellen zugegeben und gut gemischt. Den Ansatz ließ man dann 30 Min auf Eis stehen, bevor ein Hitzeschock durchgeführt wurde (90 Sek, 42°C und dann sofort wieder auf Eis). Hieran schloß sich eine 30 minütige Erholungsphase in 800 μl NZ-Medium im 37°C Schüttler an, bevor unterschiedliche Mengen (20 μl , 200 μl , 750 μl) auf Selektionsplatten (LB-Ampicillin oder LB-Choramphenicol) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

FSB:

- 10 mM K-Acetat (1 M Stocklösung auf pH 7.0 einstellen)
- 100 mM KCl
- 45 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
- 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- 3 mM HACoCl_3 (Hexaminkobaltchlorid)
- 10 % Glycerin
- mit 0.1 M HCl auf pH 6.4 einstellen
- sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

TFB:

- 10 mM K-MES (pH 6.2)
- 100 mM RbCl
- 45 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
- 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- 3 mM HACoCl_3 (Hexaminkobaltchlorid)
- sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

DTT-Stammlösung:

- 2.25 M DTT
- 40 mM K-Acetat (pH 6.0)
- Aliquots bei -20°C lagern

6.19.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Für Transformationen mit episomal replizierenden Plasmiden (z. B. YEP13) wurde in der Regel die von Ito et al. (1983) entwickelte Methode verwendet, während zur Erzeugung von chromosomalen Hefemutanten durch "gene replacement" die Sphäroplastenmethode nach Hinnen et al. (1978) verwendet wurde.

Modifizierte Lithium-Acetat Transformation

100 ml aerob in YPD-Vollmedium gewachsene Hefezellen der $OD_{600} = 1 - 2$ wurden abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 5 Min, 4 °C, 3 500 UpM) und das Sediment einmal mit TE (pH 7.5) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann mit Transformationspuffer-1 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM Li-Acetat) gewaschen, zentrifugiert und das Sediment in 1/200 des Ausgangsvolumen (0.5 ml) Transformationspuffer-1 suspendiert und 30 Min bei 30 °C leicht bewegt. Für Transformationen wurden 100 µl dieser Zellsuspension mit 0.5 bis 5 µg Plasmid DNA versetzt, und 30 Min bei 30 °C inkubiert, bevor 700 µl Transformationspuffer-2 (40 % PEG 4 000, 100 mM Li-Acetat in TE, pH 7.5) zugegeben, gemischt und für weitere 60 Min bei 30 °C inkubiert wurde. Nach dem anschließenden Hitzeschock (5 Min bei 42 °C) wurde der Transformationsansatz vorsichtig abzentrifugiert (Eppendorfischzentrifuge, 5 Min, RT, 3 500 UpM) und der Überstand entfernt. Das Sediment wurde in 300 µl Selektionsmedium resuspendiert, unterschiedliche Mengen auf Selektionsplatten ausplattiert und für mehrere Tage bei 30 °C inkubiert.

Modifizierte Sphäroplastenmethode

100 ml YPD-Vollmedium wurde mit einer Einzelkolonie des zu transformierenden Hefestammes angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur mit frischen YPD-Medium auf $OD_{600} = 1$ verdünnt und weitere 3 Std bei 30 °C inkubiert. Dann wurden 100 ml Hefekultur abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 5 Min, RT, 5 000 UpM), das Sediment in 10 ml SED (1 M Sorbit, 25 mM EDTA, pH 8, 50 mM DTT) suspendiert, 10 Min bei 30 °C geschüttelt, erneut abzentrifugiert und in 10 ml SEC (1.2 M Sorbitol, 10 mM EDTA, 0.1 M Citrat, pH 5.8) resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension gab man 65 µl Glusulase (β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix Pomatia*) und schwenkte den Ansatz leicht im 30 °C Wasserbad. Alle 15 Min wurde die OD_{600} in Wasser (100 µl Zellsuspension + 2.9 ml H₂O) bestimmt, und sobald etwa 20 - 30 % der ursprünglichen OD_{600} erreicht war, der Ansatz abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 5 Min, RT, 2 500 UpM). Die Zellen wurden vorsichtig 1 mal mit 10 ml 1.2 M Sorbit und einmal mit 10 ml STC (1.2 M Sorbit, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl₂) gewaschen, abzentrifugiert und in 0.5 ml STC ebenfalls sehr vorsichtig resuspendiert. Je 100 µl der

Zellsuspension wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und DNA zugegeben. Bei Kotransformationen wurden 0.5 µg Plasmid-DNA mit geeignetem Selektionsmarker, sowie 5 - 20 µg linearisiertes Plasmid oder isoliertes DNA-Fragment zugesetzt. Der gut gemischte Ansatz wurde 15 Min bei RT stehengelassen, dann 1 ml PEG-Stammlösung (20 % PEG 4 000, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) zugegeben, 20 Min bei RT inkubiert, abzentrifugiert (Eppendorftischzentrifuge 2 Min, RT, 2 000 UpM) und sehr vorsichtig in 150 µl SOS-Medium (YPDS-Medium mit 10 mM CaCl₂) resuspendiert. Nach einer Erholungsphase (1 Std bei 30 °C leicht bewegen) wurden die Zellen wieder abzentrifugiert (Eppendorftischzentrifuge 2 Min, RT, 2 000 UpM), in 100 µl 1.2 M Sorbit aufgenommen und unterschiedliche Mengen davon, zusammen mit 6 ml flüssigem, 48 °C warmen Weichagar (Selektionsmedium mit 1 M Sorbit und 2 % Agar) auf Selektionsplatten (Selektionsmedium mit 1 M Sorbit und 2 % Agar) gegossen. Nach 3 bis 5 Tagen Inkubation bei 30 °C waren Transformanden-Kolonien zu erkennen.

6.20 Transfer von Bakterienkolonien auf Nitrocellulose-Filter (Grunstein, 1975)

Die Koloniehybridisierung bietet die Möglichkeit, mit einer markierten spezifischen Probe nachzuweisen, ob ein bestimmtes DNA-Fragment in einem *E. coli* Klon vorhanden ist oder nicht. Es muß dazu keine DNA isoliert werden, weil die Bakterien bereits auf NC-Filter wachsen und dort auch lysiert werden.

Die zu testenden Klone wurden auf eine Agarkulturplatte und auf eine Kulturplatte, die mit einem Nitrocellulose-Rundfilter (NC-Filter) bedeckt war, ausgestrichen und eindeutig markiert. Die Bakterien auf dem NC-Filter wurden 5 - 8 Std bei 37 °C inkubiert und dann lysiert, indem der NC-Filter abgenommen und mit der Bakterienseite nach oben für 2 Min auf ein mit 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl getränktes Whatman 3 MM Papier gelegt wurde. Dann legte man den NC-Filter für 5 Min auf ein Whatman 3 MM Papier, das mit 1 M Tris-HCl (pH 7.0), 1.5 M NaCl getränkt war. Schließlich wurde der Filter einige Minuten in 3 x SSC geschwenkt, mit UV-Licht (254 nm, 2 x 6 W) für 2 - 3 Min aus einem Abstand von 7 cm bestrahlt, zwischen zwei Whatman 3MM Papieren zusammengepreßt und getrocknet. Die Filter konnten dann in diesem Zustand für Hybridisierungsexperimente verwendet werden.

6.21 Transfer von Bakteriophagen auf Nitrocellulose-Filter (Benton, 1977)

Ähnlich wie Bakterien-DNA (Koloniehybridisierung), kann auch Bakteriophagen-DNA (M13, λ) durch Hybridisierungen identifiziert werden. Dazu werden die Phagenplaques, die sich in einem Bakterienrasen ausgebildet haben, auf NC-Filter übertragen und die am Filter fixierte DNA mit markierten Proben hybridisiert.

Bevor jedoch Phagenplaques auf NC-Filter transferiert werden konnten, wurde die Kulturplatte zuerst für mindestens 1 - 2 Std bei 4 °C gekühlt, damit der Weichagar, in dem sich der Bakterienrasen und die Phagenplaques befinden, fester wurde und nicht am NC-Filter festklebte. Auf die gekühlte Agarplatte wurde dann für 1 Min ein NC-Rundfilter vorsichtig aufgelegt und die Position mit Tinte eindeutig markiert. Sollte anschließend auf eine Platte ein weiterer NC-Filter gelegt werden, so ließ man ihn doppelt so lange auf der Platte. Die Filter wurden abgenommen und genau wie bei Koloniehybridisierungen in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl denaturiert und in 1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7.0) neutralisiert. Die Filter wurden dann für 5 Min in 2 x SSC gelegt und anschließend mit UV-Licht (254 nm, 2 x 6 W) für 2 - 3 Min aus 7 cm Abstand bestrahlt. Nachdem die Filter trocken waren, konnten sie für Hybridisierungsexperimente verwendet werden.

6.22 Southern- und Northern-Blot (Southern, 1975; Thomas, 1980)

Unter dem Begriff Southern- bzw. Northern-Blot versteht man den Transfer von DNA bzw. RNA auf Nitrocellulose- oder spezielle Nylonmembranfilter (Botchan, 1976; Jeffreys, 1977). Die auf den Filtern gebundenen DNA- oder RNA-Moleküle können dadurch mit markierten spezifischen Proben hybridisiert und so identifiziert werden.

Für Southern-Blots wurde die DNA auf 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt, nach der Elektrophorese 20 Min unter leichtem Schwenken in 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH denaturiert und schließlich 20 Min in 1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 8.0) neutralisiert.

RNA wurde in denaturierenden Glyoxalgelen analysiert und brauchte für den anschließenden Saugblot, der für DNA- bzw. RNA-Transfers identisch war, nicht mehr vorbehandelt werden. Der Saugblot wurde folgendermaßen aufgebaut:

- a) eine Wanne wurde 2 cm hoch mit 20 x SSC gefüllt;
- b) in die Wanne wurde ein 4 cm dicker Schaumstoffschwamm gelegt, der mindestens so groß war wie das Gel;
- c) auf den Schwamm legte man ein in 20 x SSC getränktes Whatman 3 MM Papier;
- d) darauf legte man das vorbehandelte DNA-Agarosegel bzw. das unbehandelte Glyoxalgel;
- e) über dem Gel befand sich die in 20 x SSC äquilibrierte Nitrocellulosemembran, 2 Blatt in 20 x SSC getränktes Whatman 3 MM Papier, ein 10 cm dicker Stapel aus saugfähigem Papier und darauf eine 500 g schwere Abdeckplatte.

DNA wurde mit dieser Methode für 6 - 12 Std, RNA mindestens für 24 Std transferiert. Anschließend wurden die noch feuchten Filter mit UV-Licht (254 nm, 2 x 6 W) für 2 - 3 Min, aus einem Abstand von 7 cm bestrahlt, um die DNA bzw. RNA auf den Filtern zu fixieren (Khandjian, 1986). RNA-Blots von glyoxalierten Proben mußten zusätzlich 2 Std bei 80 °C im Vakuumofen gebacken werden, um die Glyoxalierung der RNA rückgängig zu machen. Die so behandelten Filter konnten für Hybridisierungsexperimente eingesetzt werden.

6.23 Radioaktive Markierung von DNA

6.23.1 5' Markierung von Oligodeoxynukleotiden (Maxam und Gilbert, 1980)

Die radioaktive 5' Markierung von Oligodeoxynukleotiden erfolgte in einem Volumen von 15 μ l mit 15 pM Oligodeoxynukleotid (entspricht bei einem 20mer ca. 100 ng), 100 μ Ci γ [³²P]-ATP (entspricht bei der spezifischen Aktivität von 110 TBq/mMol 20 pM ATP), 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5mM DTT, 0.1 mM Spermidin, 0.1 mM EDTA und mit 4 U T4 Polynukleotidkinase (PNK). Die Reaktion wurde 20 Min bei 37 °C inkubiert, mit 8 μ l NTE-2 (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.2 M NaCl) versetzt und 2 Min gekocht. Dann trennte man das nicht inkorporierte ATP über eine DEAE-Säule (100 μ l DEAE-Biogel A 100 - 200 mesh äquilibriert mit 5 ml NTE-2) ab, indem die gekochte Probe aufgetragen wurde, fünfmal mit 1 ml NTE-2 gewaschen und dann 200 μ l Fraktionen mit NTE-5 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl) gesammelt wurden. In Fraktion 2 und 3 befand sich die Hauptmenge der inkorporierten Radioaktivität (10 - 20 $\cdot$ 10⁶ cpm pro 200 μ l), wobei die spezifische Aktivität ungefähr bei 6 $\cdot$ 10⁶ cpm/pMol lag.

Für Hybridisierungen und Primer-Extensions Analysen wurden die markierten Oligodeoxynukleotide in der Regel ohne weitere Reinigung verwendet.

6.23.2 Radioaktive Markierung von dsDNA nach der "Random Hexamer Priming"-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1984)

Diese Methode der radioaktiven Markierung von dsDNA besitzt gegenüber der herkömmlichen "Nick-Translations-Methode" (Maniatis et al., 1975) den wesentlichen Vorteil, daß auch sehr kleine Restriktionsfragmente (200 bp) effizient radioaktiv markiert werden. Außerdem ist die spezifische Aktivität der so markierten Fragmente normalerweise höher als bei "Nick-Translationen". Das Prinzip dieser Methode beruht auf der unspezifischen Hybridisierung eines Hexamer-Deoxyribonukleotid-Gemisches an einzelsträngige DNA. Ausgehend von diesen Primern wird in Anwesenheit von α [³²P]-dCTP ein komplementärer DNA-Strang durch die Klenow Polymerase synthetisiert.

Um dsDNA Fragmente auf diese Weise radioaktiv markieren zu können, wurde der Restriktionsverdau auf einem LMP-Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte Fragment ausgeschnitten, mit drei Gewichtsanteilen Wasser verdünnt, 7 Min gekocht, 5 Min bei 37 °C inkubiert und davon ungefähr 30 - 50 ng DNA für einen Markierungsansatz verwendet. Solch ein Ansatz enthielt:

30 - 50 ng dsDNA (so wie oben beschrieben behandelt), 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 20 mM dATP, 20 μ M dTTP, 20 μ M dGTP, 50 μ Ci α [³²P]-dCTP, 200 mM HEPES (pH 6.6), 9 μ Mole Hexamer-Deoxyribonukleotid-Gemisch und 2 U Klenow Polymerase. Die

Reaktion wurde für 2 - 16 Std (je nach DNA-Menge) bei RT inkubiert, mit 200 µl Stop-Lösung (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.25 % SDS, 1 µM dCTP) gestoppt und über eine Biogel A-5 M Säule (100 - 200 mesh) gereinigt. Dazu wurde eine Pasteurpipette mit siliconisierter Glaswolle abgedichtet, mit 3 - 4 ml Säulenmaterial gefüllt, mit 5 ml TE äquilibriert und der gesamte Markierungsansatz aufgetragen. Die Probe wurde mit TE eluiert und das Eluat in 200 µl Fraktionen gesammelt. Der erste "Peak" an Radioaktivität wurde vereinigt und konnte nach erfolgter Denaturierung direkt für Hybridisierungen verwendet werden.

6.23.3 Hybridisier- und Waschbedingungen bei Hybridisierungen mit 5'-[³²P]-markierten Oligodeoxynukleotiden (Newman et al., 1983)

Unabhängig davon, ob es sich um Koloniehybridisierungen, Plaquehybridisierungen, Southernblothybridisierungen oder Northernblothybridisierungen handelte, wurden die Filter 2 - 3 Std bei 65 °C in der Vorhybridisierlösung für Oligodeoxynukleotide (6 x SSC, 0.2 % SDS, 0.2 % BSA, 0.2 % Ficoll 400 000, 0.2 % Polyvinylpyrrolidon) inkubiert, bevor sie in die eigentliche Hybridisierlösung überführt wurden. Die Hybridisierungen wurden in 50 ml Plastikröhrchen durchgeführt, die während der Hybridisierung in einer Hybridisiertrommel rotierten. Pro 50 cm² Filter wurden etwa 2 - 3 ml Hybridisierungslösung (6 x SSC, 0.2 % SDS, 0.1 % BSA, 0.1 % Ficoll 400 000, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon) und etwa 3 · 10⁶ cpm 5' endmarkierte Probe verwendet. Die Hybridisierung wurde für mindestens 3 Std bei 32 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Filter zweimal 2 Min mit 10 ml 6 x SSC, 0.1 % SDS bei 32 °C gewaschen, um den Großteil der nicht hybridisierten Probe zu entfernen. Dann wurden die Filter mit der gleichen Waschlösung bei einer Temperatur, die etwa 10 °C unterhalb der theoretisch berechneten Schmelztemperatur lag, 15 Min lang gewaschen (theoretische Schmelztemp. °C: = (Anzahl A-T Paare) x 2 + (Anzahl G-T Paare) x 4). Nach dem Waschen wurden die Filter noch feucht in Frischhaltefolie gepackt und bei -70 °C autoradiographiert.

6.23.4 Hybridisier- und Waschbedingungen bei Hybridisierungen mit [³²P]-markierten DNA-Fragmenten (Maniatis et al., 1982)

Für Hybridisierungen mit [³²P]-markierten DNA-Fragmenten wurden die Filter vorher für mindestens 5 Std bei 42 °C vorhybridisiert (Vorhybridisierlösung: 50 % deionisiertes Formamid, 5 x SSC, 0.2 % Polyvinylpyrrolidon, 0.2 % Ficoll 400 000, 0.2 % BSA, 50 mM Na-Phosphat, pH 6.5, 0.2 % SDS, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA). Die anschließende Hybridisierung erfolgte für 15 Std bei 42 °C in 50 ml Plastikröhrchen, die in

einer Hybridisiertrommel rotierten. Für 50 cm² Filter wurden etwa 2 - 3 ml Hybridisierlösung (Hybridisierlösung: 50 % deionisiertes Formamid, 5 x SSC, 0,2 % Polyvinylpyrrolidon, 0,2 % Ficoll 400 000, 0,2 % BSA, 50 mM Na-Phosphat, pH 6,5, 0,2 % SDS, 10 % Dextransulfat 500 000, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA) verwendet. Die radioaktiv markierte Probe wurde vor der Zugabe zur Hybridisierlösung durch 10 minütiges kochen denaturiert. Im Anschluß an die Hybridisierung wurde der Filter zuerst bei RT für 5 Min mit 2 x SSC, 0,2 % SDS gewaschen und dann zweimal mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS für 15 Min bei 65 °C. Die noch feuchten Filter wurden in Frischhaltefolie verpackt und bei -70 °C autoradiographiert.

6.24 Erzeugung von Deletionsmutanten durch kombinierte T4 DNA Polymerase - Mung Bean Nuklease - Klenow Polymerase Behandlung

Die hier beschriebene Methode ist eine Alternative zum Bal31 Verdau, die es aufgrund der 3' - 5'-Exonukleaseaktivität der T4 DNA Polymerase in Abwesenheit von dNTPs erlaubt, ungerichtete Deletionen, ausgehend von einer Restriktionsschnittstelle, zu generieren.

2 µg Plasmid-DNA wurden linearisiert, mit Chloropane extrahiert, mit Ethanol gefällt, in TE gelöst und in einem Volumen von 20 µl mit 3 U T4 DNA Polymerase in Abwesenheit von Deoxyribonukleosidtriphosphaten in 33 mM Tris-Acetat (pH 7,9), 66 mM K-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 0,05 mM DTT und 0,01 mg/ml BSA bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann zur Inaktivierung der T4 DNA Polymerase für 5 Min auf 65 °C erhitzt, die DNA mit Ethanol gefällt, in TE gelöst und in einem Volumen von 20 µl mit 1 U Mung Bean Nuklease, in 20 mM ZnCl₂, 5 % Glycerin, 30 mM Na-Acetat (pH 4,6) für 5 Min bei 37 °C inkubiert, um die überhängenden Enden zu entfernen. Die Reaktion wurde anschließend mit Chloropane extrahiert, mit Ethanol gefällt, in TE gelöst und in einem Volumen von 20 µl in Anwesenheit von 50 µM Deoxyribonukleosidtriphosphaten, 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO₄, 0,01 mM DTT, 5 µg/ml BSA und 5 U Klenow Polymerase für 15 Min bei 37 °C inkubiert, um glatte Enden zu erhalten. Die DNA wurde dann mit Ethanol gefällt, in TE gelöst, ligiert, erneut mit Ethanol gefällt, mit dem Restriktionsenzym, mit dem das Plasmid linearisiert worden war, nachgeschnitten, nochmals mit Chloropane extrahiert, mit Ethanol gefällt und die Hälfte des Ansatzes in kompetente *E. coli* JM109 Zellen transformiert.

Durch das Nachschneiden mit der Restriktionsendonuklease wurde das Auftreten von nicht deletierten, dem ursprünglichen Klon entsprechenden Transformanten auf 10 % reduziert.

Von den Klonen, die die Restriktionsschnittstelle verloren hatten, wurden willkürlich 10 ausgewählt und die Deletionen durch Plasmidsequenzierung näher charakterisiert. Die Deletionen waren zwischen 1 und 12 Nukleotid(e) lang.

6.25 Gerichtete in vitro Mutagenese mit Hilfe von Oligodeoxynukleotiden

Seit man in der Lage ist, Oligodeoxynukleotide beliebiger Sequenz relativ einfach und schnell maschinell zu synthetisieren, wurden immer effizientere in vitro Mutagenesemethoden entwickelt.

Die einfachste Methode (Newman, 1983), mit der die meisten in dieser Arbeit vorgestellten Mutanten erzeugt wurden, besitzt keinerlei Selektion auf den mutagenisierten M13-Strang. Das mutagene Oligodeoxynukleotid wird an den rekombinanten M13-Einzelstrang anhybridisiert und mit Klenow Polymerase wird der gesamte zweite Strang in vitro synthetisiert. Die Vermehrung der rekombinanten M13 Phagen in *E. coli* unterliegt keinerlei Selektion auf den einen oder den anderen Strang und es müssen deshalb Klone mit mutagenisierten Sequenzen über Plaquehybridisierungen identifiziert werden.

Bei der von Kunkel (1985) beschriebenen Methode wird auf den neu synthetisierten M13-Strang selektioniert, weil eine uracilhaltige Matrizen-DNA für die in vitro Mutagenese benutzt wird und die anschließende Vermehrung in ung⁻-Stämmen erfolgt. Solche *E. coli* Stämme sind nicht in der Lage uracilhaltige DNA zu vermehren, weshalb eine selektive Vermehrung des mutagenisierten Stranges erfolgt und die Ausbeute an mutagenisierten Material auf diese Weise erhöht wird.

Die von Kramer et al. (1984) und Kramer und Fritz (1987) beschriebene "gapped duplex DNA"-Methode zur in vitro Mutagenese mittels Oligodeoxynukleotiden besitzt drei weitere Vorteile:

- 1) Dadurch, daß an den rekombinanten M13-Einzelstrang nicht nur der mutagene Primer, sondern auch der komplementäre Einzelstrang des Vektors anhybridisiert wird, braucht nicht mehr der gesamte Vektor synthetisiert zu werden. Dies verhindert zum einen Fehler, die bei der Synthese des zweiten Strangs durch den Einbau falscher Nukleotide auftreten können, und zum anderen werden so mögliche Kreuzhybridisierungen des mutagenen Primers mit Vektorsequenzen verhindert.
- 2) Das pM(a/c) System besitzt den Vorteil, daß sehr einfach durch Antibiotika auf den mutagenen Einzelstrang selektioniert werden kann.
- 3) Das pM(a/c) System bietet die Möglichkeit, mehrere Mutagenesen nacheinander durchzuführen, ohne daß eine erneute Subklonierung notwendig ist. Dies wird dadurch ermöglicht, daß es sich um ein Vektorenpaar handelt, das zwei Antibiotikaresistenzen (Ampicillin oder Chloramphenicol) trägt, wobei im pMa Vektor das cat-Gen und im pMc Vektor das bla-Gen eine Amber-Mutation besitzen. Benutzt man nun bei der "gapped duplex DNA"-Mutagenese als komplementären Strang den des Partnervektors, so kann nicht nur einmal, sondern auch in jeder weiteren Mutageneserunde immer wieder sehr einfach, auf den jeweils mutagenisierten Strang selektioniert werden.

Voraussetzung für alle in vitro Mutagenese Experimente war es, die zu mutagenisierenden DNA-Fragmente in die entsprechenden M13 oder pM(a/c) Vektoren zu klonieren und einzelsträngige DNA (ssDNA) zu isolieren.

Alle Mutagenese-Oligodeoxynukleotide wurden so konzipiert, daß 5' und 3' von der zu mutagenisierenden Stelle etwa 10 - 15 Nukleotide völlig komplementär zur Matrize waren, und so auf beiden Seiten ein theoretischer Schmelzpunkt von 22 - 39 °C, (geltend für die Annahme, daß ein A-T Paar 2 °C und ein G-C Paar 4 °C beiträgt) vorlag. Außerdem wurde darauf geachtet, daß das 5' Ende des mutagenen Primers etwas stärker an die Matrize binden konnte als das 3' Ende.

6.25.1 In vitro Mutagenese im M13 System

Die gereinigten Mutagenese-Oligodeoxynukleotide mußten zuerst durch T4 Polynukleotidkinase (PNK) am 5' Ende mit einer Phosphatgruppe versehen werden. Dazu wurde 1 µg des Primers in einem Volumen von 20 µl mit 0.5 µl γ -[³²P]-ATP (5 000 Ci/mM), 2 µl ATP (1 mM), 2 µl 10 x Kinasepuffer (500 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM EDTA) und 4 U PNK bei 37 °C inkubiert. Nach 20 Min wurden nochmals 4 U PNK zugegeben und weitere 20 Min bei 37 °C inkubiert, bevor der Ansatz für 5 Min auf 70 °C erhitzt wurde, um das Enzym zu inaktivieren. Nach Zusatz von 1 µg tRNA wurde das Oligodeoxynukleotid mit Ethanol gefällt und in 1 ml NTE-2 (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl) gelöst. Zur Entfernung des nicht gebundenen ATP wurde der Ansatz über eine DEAE-Cellulose Säule gegeben (vgl. 5' Markierung von Oligodeoxynukleotiden), die Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt, mit 2 µl Glycogen versetzt, mit Ethanol gefällt und in 20 µl TE gelöst.

1 µg der rekombinanten einzelsträngigen M13 DNA, 3 µl 5 x Klenow-Puffer (500 mM HEPES, pH 7.5, 33 mM Mg₂Cl, 250 mM NaCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol) und 5 µl des phosphorylierten Primers wurden in einem Gesamtvolumen von 12 µl für 1 Min auf 80 °C erhitzt und langsam (30 Min) auf RT abgekühlt. Dann wurden 3 µl dNTP-Mix (2.5 mM dNTPs in 20 mM DTT) und 4 U Klenow Polymerase zugegeben. Der Ansatz wurde für 2 - 4 Std bei RT inkubiert, dann 1 µl ATP (20 mM) und 200 U T4 DNA Ligase zugegeben und über Nacht bei 12 °C ligiert.

2 µl dieser Reaktion wurden dazu benutzt, kompetente JM101 oder JM109 *E. coli* Zellen zu transformieren. Nach dem Hitzeschock wurden 2 µl, 20 µl und der Rest des Transformationsansatzes mit 200 µl JM101 oder JM109 Zellen (OD₆₀₀ = 0.3) sowie 3 ml flüssigem, 45 °C warmen H-Weichagar gemischt und auf H-Platten gegossen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet und mit solchen Platten, auf denen etwa 100 - 1 000 Plaques zu sehen waren, wurden Plaquehybridisierungen mit dem 5'-[³²P]-markierten mutagenen Primer durchgeführt. Die unter stringenten Bedingungen positiv hybridisierenden

Plaques wurden ausgestochen, doppel- und einzelsträngige DNA präpariert und durch Sequenzierung überprüft.

H-Weichagar: 10 g/l Bacto Trypton
 8 g/l NaCl
 8 g/l Agar
 - autoklavieren und im Wasserbad auf 45 °C abkühlen lassen

H-Platten: 10 g/l Bacto Trypton
 8 g/l NaCl
 12 g/l Agar
 - autoklavieren und in sterile Petrischalen gießen

6.25.2 "Gapped duplex DNA" in vitro Mutagenese mit pM(a/c)-Vektoren

Wie bereits oben erwähnt, mußte zuerst das zu mutagenisierende DNA-Fragment in einen der zwei Vektoren subkloniert und rekombinante einzelsträngige DNA isoliert werden (siehe Präparation von Einzelstrang-DNA). Außerdem mußte aus dem Partnervektor ein doppelsträngiges Restriktionsfragment isoliert werden, das den gesamten Vektor, jedoch nicht die multiple Klonierungsstelle enthält. Die Phosphorylierung des mutagenen Primers erfolgte genauso, wie sie für das M13 System oben beschrieben ist.

Herstellung von "gapped duplex DNA"

Zur Herstellung von "gapped duplex DNA" wurden 0.5 pMole rekombinante ssDNA mit 0.1 pMole doppelsträngigem Restriktionsfragment und 5 µl 1.5 M KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) in einem Volumen von 40 µl gemischt, für 5 Min auf 100 °C erhitzt und anschließend für 10 Min bei 65 °C inkubiert.

Anhybridisieren des Primers

8 µl der "gapped duplex DNA"-Lösung wurden mit 4 - 5 pMolen (2 µl) des phosphorylierten Primers gemischt, 5 Min bei 65 °C inkubiert und langsam (30 Min) auf RT abgekühlt. Zu diesem Ansatz wurde dann 24 µl Wasser, 4 µl 10 x Auffüllpuffer (625 mM KCl, 275 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 0.5 mM ATP, 0.25 mM dNTPs) und 1 U Klenow Polymerase sowie 200 U T4 Ligase gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 45 Min bei RT inkubiert und anschließend 5 µl zur Transformation des *E. coli* WK6mutS Stammes verwendet. Nach der Erholungsphase wurde mit dem gesamten Transformationsansatz eine 10 ml Flüssigkultur angesetzt und mit dem entsprechende Antibiotikum auf den mutagenisierten Strang selektioniert. Am nächsten Tag wurde aus 1.5 ml Bakterienkultur

Plasmid-DNA isoliert und mit 20 ng davon *E. coli* WK6 Zellen transformiert. Da die Mutageneseausbeuten bei dieser Methode in der Regel größer als 50 % sind, genügte es, mehrere einzelne Klone auszuwählen, Plasmid-DNA zu isolieren und durch Sequenzierung die Mutationen nachzuweisen.

6.26 In vitro Synthese von mRNA-Vorläufermolekülen

Um in vitro *MATa1*-Vorläufer-mRNA erzeugen zu können, wurde das *MATa1* Gen vor den Promotor des Bakteriophagen SP6 aus *Salmonella typhimurium* kloniert. Es wurde dafür das pSP64/65 Vektorsystem (Melton et al., 1984), das unmittelbar an den SP6-Promotor anschließend die multiple Klonierungsstelle aus pUC12 bzw. pUC13 (Vieira und Messing, 1982) besitzt, verwendet. RNA Moleküle definierter Länge wurden erzeugt, indem die Matrizen-DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Um radioaktiv markierte RNA zu erhalten, wurde α [³²P]-UTP dem Transkriptionsansatz zugesetzt. Ein typischer in vitro Transkriptionsansatz für radioaktiv markierte RNA sah folgendermaßen aus:

0.5 - 1 μ g doppelsträngige, linearisierte Matrizen-DNA, 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM Spermidin, 10 mM DTT, 6 mM MgCl₂, 1.5 mM m⁷G(5')ppp(5')G, 10 μ g/ml BSA, 1 U/ μ l RNasin, 330 μ M UTP, 166 μ M ATP / CTP / GTP, 2.5 pM α [³²P]-UTP (800 Ci/mMol = 20 μ Ci/ μ l), 10 - 20 U SP6 Polymerase. Die hohe Konzentration an "kaltem" UTP erklärt sich durch den hohen Gehalt an Uridin (40 %) in den *MATa1* Transkripten. Bei der Synthese von nicht radioaktiv markierten Transkripten wurde die Konzentration an kaltem UTP noch weiter, d. h. auf 660 μ M erhöht. Alle Reaktionen wurden für 1 Std bei 40 °C durchgeführt, anschließend 1 Volumen Formamidauftragspuffer zugegeben, 2 Min gekocht und der gesamte Ansatz in einem 5 % Polyacrylamid / 8 M Harnstoffgel (20 cm x 20 cm x 0,3 mm) bei 30 Watt für 2 Std aufgetrennt. Nicht-radioaktiv markierte RNA wurde durch UV-Lichtlöschung (254 nm) detektiert und aus dem Gel ausgeschnitten, während radioaktiv markierte RNA durch Autoradiographie detektiert und ebenfalls aus dem Gel ausgeschnitten wurde. Die Gelstückchen wurden mit 400 μ l Gelelutionspuffer (500 mM NH₄-Acetat, pH 5.2, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 % SDS, 3 ng/ μ l tRNA) in Eppendorfreaktionsgefäßen für 1 - 2 Std geschüttelt, die eluierte RNA mit Ethanol gefällt und in 20 μ l Wasser gelöst. Durchschnittlich wurden etwa 2 pMole RNA pro Ansatz synthetisiert.

6.27 Präparation von Hefe-Gesamtzellextrakten für in vitro Spleißanalysen

Lin et al. haben 1985 zum ersten Mal beschrieben, wie aus Hefekulturen Gesamtzellextrakte gewonnen werden können, die in der Lage sind, in vitro synthetisierte Vorläufer-mRNA

Moleküle korrekt zu spleißen. 1986 wurde dann von Cheng und Abelson eine Methode beschrieben, wie aus solchen Hefe-Gesamtzellextrakten Fraktionen mit unterschiedlichen Spleißaktivitäten gewonnen werden können. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen am *MATa1* Gen genügte es jedoch, Hefe-Gesamtzellextrakte nach Lin et al. (1985) zu verwenden.

Dazu wurde 1 Liter logarithmisch wachsende Hefekultur (EJ101, IM1783 oder IM1784) in YPD-Medium mit der $OD_{600} = 2 - 4$ abzentrifugiert (Sorvall, GS3 Rotor, 5 000 UpM, 5 Min, RT), das Sediment in 15 ml S1-Puffer (1 M Sorbit, 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 30 mM DTT) suspendiert, in 50 ml Plastikröhrchen überführt, und 15 Min bei RT stehengelassen. Anschließend wurde wieder zentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 5 000 UpM, 5 Min, RT), das Sediment in 15 ml S2-Puffer (1 M Sorbit, 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 3 mM DTT) resuspendiert, 90 ml Zymolyase 100 000-Lösung (20 mg/ml) in 20 mM K-Phosphat (pH 7.4) und 5 % Glucose zugesetzt und bei 30 °C bewegt. Der Grad der Sphäroplastenbildung wurde anhand der Abnahme der OD_{800} bei Zusatz von 10 % SDS (2.9 ml 10 % SDS + 100 ml Zellsuspension) bestimmt. Innerhalb von 45 Min sollte die OD_{800} auf etwa 20 % gesunken sein; war dies nicht der Fall, so wurde die Präparation verworfen. Ansonsten wurden von nun an alle Schritte bei 4 °C durchgeführt.

Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 3 000 UpM, 5 Min, 4 °C), in 15 ml S2-Puffer gewaschen, erneut abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 3 000 UpM, 5 Min, 4 °C), in 8 ml hypotonen Puffer A (10 mM HEPES, pH 7.9 bei 4 °C, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT) suspendiert und in einen 30 ml Glashomogenisator überführt. Die Sphäroplasten wurden in diesem Homogenisator durch 4 - 8 Stöße mit dem Pistill aufgebrochen, in ein kleines Becherglas überführt und tropfenweise unter Rühren 1/10 Volumen 2 M KCl zugesetzt. Auf Eis wurde noch 30 Min weitergerührt, bevor der Ansatz abzentrifugiert (Sorvall, SS34 Rotor, 17 000 UpM, 30 Min, 4 °C), der Überstand erneut zentrifugiert (Beckman UZ, SW60-Ti, 37 000 UpM, 1 Std, 4 °C) und anschließend dieser Überstand, ohne die sich auf der Oberfläche des Gradienten befindende Lipidphase zweimal 1.5 Std gegen je 1 Liter Dialysepuffer D (20 mM HEPES, pH 7.9 bei 4 °C, 20 % Glycerin, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT) bei 4 °C dialysiert wurde (Spectra/Por Dialysemembran, MW cutoff: 6 000 - 8 000). Aliquots zu 100 - 400 ml wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt. Aktive Extrakte behielten ihre Spleißaktivität über mehrere Monate.

6.28 In vitro Spleißreaktionen von Hefe mRNA-Vorläufermolekülen

In vitro Spleißreaktionen wurden etwas modifiziert nach dem Protokoll von Lin et al. (1985), durchgeführt. Das heißt, etwa 200 fMole in vitro synthetisierte und gereinigte Vorläufer-mRNA wurden in 40 %igen Hefe-Spleißextrakt, 60 mM K-Phosphat (pH 7.8), 3 %

PEG 8 000, 2.5 mM $MgCl_2$ und 2 mM ATP bei 30 °C unterschiedlich lang inkubiert. Das Volumen betrug in der Regel 30 μ l. Falls anschließend eine Analyse der Reaktion durch Glyceringradientenzentrifugation erfolgte, wurde ein doppelter Spleißansatz (60 μ l mit 200 000 cpm / 400 fMole RNA), für Primer-Extensions Analysen ein 15 μ l Ansatz (in der Regel mit nicht radioaktiv markierter RNA, 100 - 200 fMole), und für Analysen auf nativen Polyacrylamid-Agarosegelen je 5 μ l Aliquots der 30 μ l Spleißansätze (100 000 cpm / 200 fMole) verwendet.

Die direkte Analyse von Spleißprodukten auf denaturierenden Gelen oder durch Primer-Extensions Analysen erforderte es, daß die Spleißreaktionen gestoppt und mit Phenol extrahiert werden mußten. Dazu wurden die Spleißansätze zusammen mit 300 μ l Stop-Puffer (100 mM NaCl, 4 mM EDTA, 67 mM Na-Acetat, pH 5.2, 0,2 % SDS, 6 μ g/ml *E. coli* tRNA) und 300 μ l Phenol / TE extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann mit Chloroform / Isoamylalkohol (24 / 1) extrahiert und die RNA mit Ethanol gefällt. Die präzipitierte RNA wurde in Wasser (10 μ l) gelöst und konnte so direkt durch Primer-Extensions Experimente analysiert werden.

6.29 Primer-Extensions Analysen (Domdey et al., 1984)

Durch Primer-Extensions Analysen mit einem spezifisch hybridisierenden Primer (5'-[^{32}P]-endmarkiertes Oligodeoxynukleotid), der die Synthese einer cDNA entlang einer RNA-Matrize initiiert, können erstens die 5' Enden von RNA-Molekülen bestimmt werden und zweitens RNA-Moleküle identifiziert und quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurden Primer-Extensions Experimente hauptsächlich dazu benutzt, spezifische RNAs (Vorläufer-mRNAs, prozessierte mRNAs) zu identifizieren und zu quantifizieren, wobei für eine Analyse entweder die phenolextrahierte RNA aus einem 15 μ l Spleißansatz oder 50 - 100 μ g Hefe-Gesamt-RNA oder 2 - 5 μ g Hefe-Poly(A)⁺RNA verwendet wurden.

Die RNA wurde zusammen mit 150 fMolen an 5'-[^{32}P]-markiertem Primer (ca. 100 000 cpm) in 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 150 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 7 mM $MgCl_2$ und 50 mM dNTPs, wobei eines der Deoxyribonukleosidtriphosphate jeweils durch das entsprechende Dideoxyribonukleosidtriphosphat in einem 5fach molaren Überschuß gegenüber den dNTPs ersetzt wurde, in einem Volumen von 24 μ l für 5 Min auf 65 °C erhitzt. Im Wasserbad ließ man die Proben langsam (innerhalb von 30 Min) auf 42 °C abkühlen und setzte dann 5 U Reserve Transkriptase zu. Die Reaktion wurde 30 Min bei 42 °C inkubiert und anschließend die RNA durch alkalische Hydrolyse degradiert (+ 6 μ l 0.5 M NaOH; 3 Min 100 °C) und neutralisiert (+ 6 μ l 0.5 M HCl; + 6 μ l 1 M Tris-HCl, pH 8.0).

Die Proben wurden dann mit Ethanol gefällt, in 5 µl Formamidauftragspuffer aufgenommen und auf einem denaturierenden 12 % Polyacrylamid / 8 M Harnstoffgel aufgetrennt. Das Gel wurde in Frischhaltefolie verpackt und autoradiographiert.

Sollte das 5' Ende einer RNA bestimmt werden, so wurden bei der Reversen Transkription alle vier dNTPs und kein ddNTP verwendet. Je nach der Länge des erwarteten cDNA Transkripts wurde der Ansatz auf 6 - 12 %igen Polyacrylamid / 8 M Harnstoffgelen entlang von radioaktiv markierten Längenstandards analysiert.

6.30 Analyse von Spleißkomplexen auf Glyceringradienten

Während des Spleißprozesses bilden sich Spleißkomplexe ("Spliceosomen") aus, die aus verschiedenen RNAs und Proteinen bestehen. Diese Spleißkomplexe können als ATP-abhängige, bei etwa 40S sedimentierende Komplexe auf Glyceringradienten aufgetrennt und nachgewiesen werden (Brody und Abelson, 1985).

Die Glyceringradienten (15 % - 40 %) wurden dazu mit einem Gradientenmischer aus einer 15- und einer 40 %igen Glycerinlösung (in 20 mM HEPES, pH 7.0, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM DTT) in SW41 Polyallomerzentrifugenröhrchen erzeugt und mindestens 2 Std bei 4 °C vorgekühlt.

Ein 60 µl in vitro Spleißansatz (200 000 cpm) wurde 15 Min bei 30 °C inkubiert, vorsichtig auf den Glyceringradienten aufgetragen und sofort für 12 Std bei 4 °C und 35 000 UpM im Beckman SW41 Rotor zentrifugiert. Mit einer Pumpe wurden die Gradienten anschließend von unten nach oben in 400 µl Aliquots fraktioniert und im Scintillationszähler die Cerenkov-Strahlung bestimmt.

6.31 Analyse von Spleißkomplexen auf nativen Polyacrylamid-Agarosegelen

Während in Glyceringradienten nur die Spleißkomplexbildung als solche erkannt werden kann, gestattet es die native Gelelektrophorese von Spleißkomplexen auf Polyacrylamid-Agarosegelen, auch Zwischenstufen des Spleißvorgangs zu identifizieren.

Die Analyse wurde bis auf das Polyacrylamid-Agarosegel, das nach einem Rezept von K. Hartmut (persönliche Mitteilung) gefertigt wurde, genau nach dem von Newmann (1987) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Ein 30 µl in vitro Spleißansatz mit α-[³²P]-UTP markierter Vorläufer-mRNA wurde bei 30 °C inkubiert. Zu definierten Zeiten wurden 5 µl Aliquots entnommen, mit 2.5 µl Stopplösung (5 mM DTT, 50 mg/ml Heparin, 10 U/µl RNasin) versetzt und auf Eis gestellt. Die Proben wurden dann mit 2 µl Auftragspuffer S (50 % Glycerin, 2.5 x TBE, 0.1 % BPB) gemischt, auf das bei 4 °C vorelektrophoretisierte Polyacrylamid-Agarosegel (20 cm x 20 cm

x 0.15 cm) aufgetragen und 16 Std bei 4 °C und 100 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf einer Whatman DEAE Membran (DE 81) im Wasserstrahlvakuum bei 60 °C getrocknet und schließlich autoradiographiert.

6.32 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Nach dem Prinzip der Sanger-Sequenzierung (Sanger, 1977), die auf den Einbau von ddNTP-Stopnukleotiden bei der Kettenverlängerungsreaktion entlang einer einzelsträngigen DNA-Matrize beruht, können nicht nur einzelsträngige DNA Moleküle, sondern auch denaturierte doppelsträngige Plasmid-DNAs sequenziert werden (Chen und Seeburg, 1985).

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Protokolle benutzt. Zum einen wurden Sequenzanalysen nach einem Protokoll von Heinrich (1986) durchgeführt, und zum anderen wurde ein Sequenzier-Kit, der alle notwendigen Lösungen, Puffer und Enzyme enthielt, von United States Biochemicals benutzt.

Der Vorteil des Sequenzier-Kits lag darin, daß die eigentliche Kettenverlängerungsreaktion von der radioaktiven Markierung der entstehenden Ketten entkoppelt war. Dies führte dazu, daß alle Ketten, ob kurz oder lang, gleich stark radioaktiv markiert waren. Sehr lange DNA-Fragmente waren deshalb auf der Autoradiographie besser zu identifizieren.

Alle DNA-Sequenzanalysen wurden mit [³⁵S]-dATP durchgeführt, wodurch die Bandenschärfe bei der Autoradiographie verbessert wurde. Allerdings hat dies den Nachteil, daß die Sequenzgele auf den Glasplatten oder auf Whatmann 3 MM Papier getrocknet werden müssen.

6.32.1 Plasmidsequenzierung mit Klenow Polymerase

0.5 - 1 pMol doppelsträngige Plasmid-DNA wurde in 40 µl Denaturierungspuffer (0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA) gelöst und 15 Min bei RT geschüttelt, anschließend durch Zugabe von 4 µl 2 M NH₄-Acetat-Lösung (pH 4.5) neutralisiert und mit 2 Volumen Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die DNA wurde in 9.5 µl H₂O gelöst, 1.5 µl 10 x "Anneal"-Puffer (70 mM Tris-HCl, pH 7.5, 70 mM MgCl₂, 50 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA), 2.5 pMole Sequenzierprimer und 2 µl α[³⁵S]-dATP (8.1 uCi/µl, 650 Ci/mmol) zugesetzt, und 15 Min bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluß an diese Hybridisierungsreaktion startete man die Reaktion mit 1 µl Klenow Polymerase (2 U), und pipettierte je 3 µl der Reaktion in vier Eppendorfreaktionsgefäße, in die je 2 µl G_O⁻, A_O⁻, T_O⁻, oder C_O-Mix vorgelegt worden war (Zusammensetzung der Mixe siehe unten).

Die Reaktionsgemische wurden für 20 Min bei 30 °C inkubiert, je 2 µl "Chase"-Lösung (125 mM dATP, 125 mM dTTP, 125 mM dGTP, 125 mM dCTP) zugegeben und weitere 15 Min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Proben im Vakuum getrocknet, in 4 µl Formamidauftragspuffer aufgenommen, 3 Min bei 100 °C gekocht und sofort auf Sequenzgele aufgetragen.

	A _O -Mix (µM)	C _O -Mix (µM)	G _O -Mix (µM)	T _O -Mix (µM)
dTTP	100	100	100	5
dCTP	100	10	100	100
dGTP	100	100	5	100
ddGTP			120	
ddCTP		100		
ddATP	100			
ddTTP				500

6.32.2 Plasmidsequenzierung mit Sequenase

Die Sequenzierung mit der modifizierten T7 Polymerase (Sequenase™) erfolgte ausschließlich mit den mit dem Enzym mitgelieferten Substanzen, und exakt so, wie es im Protokoll der Herstellerfirma (USB) vorgeschlagen wurde. Die eingesetzten Mengen an Plasmid-DNA und Primer sowie die Durchführung der Gelelektrophorese waren völlig identisch zu der vorher beschriebenen Plasmidsequenzierung mit der Klenow Polymerase. Unterschiede gab es lediglich bei der Markierung und der Kettenverlängerungsreaktion. Im einzelnen sah das Protokoll folgendermaßen aus:

Die denaturierte Plasmid-DNA wurde in 7 µl H₂O gelöst, 2 µl 5 x Sequenase-Puffer und 1 µl Primer (2.5 pMole) zugegeben. Der Ansatz wurde 2 Min bei 65 °C erhitzt und langsam auf RT (30 Min) abgekühlt. Weiter setzte man 1 µl 0.1 M DTT, 2 µl verdünnten (1:10) "Markier-Mix", 0.5 µl α-[³⁵S]-dATP, 2 µl verdünnte (1:8) Sequenase zu, mischte und inkubierte 5 Min bei RT. Anschließend wurden je 3.5 µl dieses Ansatzes zu je 2.5 µl ddA-, ddG-, ddT-, und ddC-Stopplösung pipettiert, gemischt und weitere 5 Min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 4 µl Auftragspuffer gestoppt. Ohne das Volumen der Sequenzreaktion vorher einzuengen, wurden die Proben 3 Min gekocht und auf Sequenzgelen aufgetragen.

Verwendete Lösungen und Puffer:

5 x Sequenase-Puffer:
 200 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 100 mM MgCl₂
 250 mM NaCl

5 x "Markier-Mix":

7.5 μM dGTP

7.5 μM dCTP

7.5 μM dTTP

ddG-Stopplösung:

80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dTTP, 80 μM dCTP,

8 μM ddGTP, 50 μM NaCl

ddA-Stopplösung:

80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dTTP, 80 μM dCTP,

8 μM ddATP, 50 μM NaCl

ddT-Stopplösung:

80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dTTP, 80 μM dCTP,

8 μM ddTTP, 50 μM NaCl

ddC-Stopplösung:

80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dTTP, 80 μM dCTP,

8 μM ddCTP, 50 μM NaCl

Auftragspuffer:

95 % Formamid

20 mM EDTA

0.05 % BPB

0.05 % XC

Sequenase: keine Aktivitätsangabe von USB

α [^{35}S]-dATP: 800 Ci/mMol, 8.1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

6.32.3 Sequenzierung von einzelsträngiger DNA

Einzelsträngige DNA aus M13 Phagen konnte problemlos nach dem Klenow- und Sequenase-Protokoll sequenziert werden. Eingesetzt wurden etwa 2 - 3 μg ssDNA, die für die Sequenzreaktion nicht denaturiert zu werden brauchte. Die Vorgehensweise war ansonsten völlig identisch zur Plasmidsequenzierung.

6.32.4 RNA-Sequenzierung durch Primer-Extension

Die Sequenz einer RNA läßt sich außer durch direkte Sequenzierung, auch durch eine modifizierte Primer-Extensions Reaktion bestimmen. Dabei wird mit einem für die RNA spezifischen Oligodeoxynukleotid, das am 5' Ende mit [^{32}P]-markiert ist, eine Sequenzreaktion, ähnlich der von Sanger (1977) beschriebenen DNA-Sequenziermethode durchgeführt. Es ist sogar möglich, die Sequenzreaktion mit einem gemischten Oligodeoxynukleotid durchzuführen, d. h. mit einem Oligodeoxynukleotidgemisch das nicht

vollständig komplementär zur RNA-Matrize ist. Obwohl die daraus resultierenden Sequenzleitern lange nicht so gut sind wie die von DNA-Sequenzierungen, bietet diese Methode doch den enormen Vorteil, daß Sequenzen von Genen bestimmt werden können, die nicht kloniert sind und von denen nur DNA-Teilsequenzen oder Aminosäure-Teilsequenzen bekannt sind.

Für die RNA-Sequenzanalyse benötigte man 500 fMole 5'-[³²P]-endmarkiertes Oligodeoxynukleotid (ca. 500 000 cpm) sowie 200 µg Gesamt-RNA oder 5 µg Poly(A)+RNA. Primer und RNA wurden kopräzipitiert, das Präzipitat in 8 µl Wasser gelöst und je 2 µl davon zu 22 µl G_S-, A_S-, T_S- und C_S-Lösung pipettiert. Diese vier Ansätze wurden dann für 5 Min auf 65 °C erhitzt, langsam, d. h. innerhalb von 15 Min auf 42 °C abgekühlt und die Reaktionen mit je 1 µl Reverser Transkriptase (5 U/µl) gestartet. Nach 15 Min Inkubation bei 42 °C setzte man jeder Reaktion 1 µl 2.5 mM dNTP-Mix zu und inkubierte weitere 15 Min bei 42 °C. Anschließend wurde die RNA durch alkalische Hydrolyse degradiert (+ 6 µl 0.5 M NaOH; 3 Min kochen), die Ansätze neutralisiert (+ 6 µl 0.5 M HCl; + 6 µl 1 M Tris-HCl, pH 8.0) und mit Ethanol gefällt. Die in 5 µl Formamidauftragspuffer gelösten Präzipitate wurden 3 Min auf 100 °C erhitzt und in 12 % Polyacrylamid (AA:Bis = 29:1) / 8 M Harnstoffgelen analysiert.

Verwendete Lösungen:

- G_S: 56 mM Tris-HCl (pH 8.3), 172 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT,
56 µM dGTP, 56 µM dATP, 56 µM dTTP, 56 µM dCTP,
70 µM ddGTP
- A_S: 56 mM Tris-HCl (pH 8.3), 172 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT,
56 µM dGTP, 56 µM dATP, 56 µM dTTP, 56 µM dCTP,
70 µM ddATP
- T_S: 56 mM Tris-HCl (pH 8.3), 172 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT,
56 µM dGTP, 56 µM dATP, 56 µM dTTP, 56 µM dCTP,
140 µM ddTTP
- C_S: 56 mM Tris-HCl (pH 8.3), 172 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT,
56 µM dGTP, 56 µM dATP, 56 µM dTTP, 56 µM dCTP,
140 µM ddCTP

6.33 Identifizierung und Isolierung der DNA positiv hybridisierender λ-Phagen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Genbanken gearbeitet. Einerseits wurde eine käuflich erworbene genomische Hefegenbank in λgt11 benutzt, bei der die durchschnittliche Größe der Insertionen ca. 2 Kbp betrug. Diese Expressionsgenbank war erzeugt worden, indem chromosomale Hefe-DNA mechanisch fragmentiert und 3 - 6 Kbp große Fragmente über Agarosegelelektrophorese isoliert worden war. Diese Fragmente waren dann mit EcoRI-"Linkern" versehen, anschließend mit EcoRI geschnitten und mit EcoRI

gespaltener λ gt11 DNA verknüpft sowie in vitro verpackt worden. Etwa 22 % der λ -Phagen dieser Genbank trugen eine Insertion aus dem Hefegenom und der Phagentiter betrug $5 \cdot 10^9$ pfu/ml.

Die zweite Genbank, die benutzt wurde, war von Michael Duchêne, Genzentrum München, angelegt worden. Es handelte sich dabei ebenfalls um eine genomische Hefe-Genbank, jedoch in λ EMBL3A-Phagen. Diese Genbank hatte den Vorteil, daß die durchschnittliche Größe der Insertionen 15 - 20 Kbp betrug. Ein weiterer Vorteil dieser Genbank war, daß aufgrund der Verwendung des Wirtstammes NM539 [*supF*, *hsdR*, (P2cox3)] (Frischauf et al., 1983) eine Selektion auf rekombinante λ -Phagen ausgeübt werden konnte. Bei der Erzeugung dieser Genbank wurde genomische Hefe-DNA partiell mit SauIIA-gespalten und 15 - 20 Kbp große DNA Fragmente durch Sucrose Gradienten Zentrifugation isoliert. Die DNA wurde dann mit den Armen von BamHI-geschnittener λ EMBL3A-DNA verknüpft und in vitro verpackt. Der Titer der Genbank betrug $4 \cdot 10^5$ pfu/ml.

6.33.1 Identifizierung und Isolierung positiv hybridisierender λ -Phagen aus einer λ EMBL3A Genbank

Um mit 99%iger Wahrscheinlichkeit sicher zu gehen, daß in den ausplattierten Phagen das gesuchte Gen enthalten ist, benötigt man ca. 5 Genomäquivalente. Bei einer durchschnittlichen Insertionsgröße von 15 Kbp und der angenommenen Genomgröße von 14×10^6 bp müssen somit etwa 4 000 Phagenklone ausplattiert werden. Deshalb wurden 10 Ansätze mit je 12 μ l der Genbank (40 pfu/ μ l) mit 100 μ l *E. coli* NM539 Zellen (dreifach konzentrierte logarithmisch wachsende Kultur) für 20 Min bei 37 °C inkubiert. Anschließend setzte man je 4 ml flüssige Tryptikase-Weichagarose zu, mischte und überschichtete damit eine Tryptikase-Platte (9 cm Durchmesser). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend für 2 Std bei 4 °C gekühlt. Von den vorgekühlten Platten wurden dann je zwei Nitrocellulosefilter abgezogen, die Phagen-DNA denaturiert, neutralisiert und durch UV-Licht auf dem Filter fixiert (siehe Koloniehybridisierung). Diese Filter wurden dann unter den üblichen Bedingungen mit radioaktiven Proben hybridisiert und positiv hybridisierende Phagenklone identifiziert. Die auf diese Weise identifizierten Phagenplaques wurden aus der Agarplatte ausgestochen und in 500 μ l SM-Puffer plus 10 μ l Chloroform suspendiert.

Um aus einem λ -Klon genügend DNA für Subklonierungen isolieren zu können, müssen die Phagen vorher vermehrt werden. Diese Vermehrung erfolgt in zwei Stufen: Zunächst werden die Phagen auf einer Platte und später in einer Flüssigkultur vermehrt.

Von den identifizierten positiv hybridisierenden Klonen wurden deshalb 200 μ l Phagensuspension mit 100 μ l *E. coli* NM539 Zellen 20 Min bei 37 °C inkubiert, mit 4 ml flüssiger Tryptikase-Weichagarose gemischt und auf Tryptikase-Platten verteilt. Die Platten

wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet, so daß am nächsten Tag ein fast konfluenten "Plaquerasen" entstand. Die Platten wurden dann mit 5 ml SM-Puffer überschichtet und 4 Std bei Raumtemperatur bewegt. Anschließend wurde der SM-Puffer abpipettiert, mit 100 µl Chloroform versehen, abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 10 Min, 5 000 Upm, RT) und der Überstand erneut mit Chloroform versetzt (Endkonz.: 0.05 %). 1 ml dieser Phagensuspension (ca. 10⁸ Phagen) wurden dann mit 3 ml *E. coli* NM539 Zellen (ca. 10¹⁰ Zellen) gemischt, 20 Min bei 37 °C inkubiert und in 500 ml vorgewärmtem NZ-Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt (120 Upm). Zu der Kultur wurden am nächsten Tag 10 ml Chloroform zugegeben und weitere 30 Min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die bakterielle DNA und RNA durch Zugabe von je 400 µg DNase I und RNase A während einer Inkubation von 30 Min bei Raumtemperatur degradiert. Die Kultur wurde dann abzentrifugiert (Sovall GS3 Rotor, 9 000 Upm, 17 Min, 4 °C) und der Überstand mit NaCl (Endkonz.: 0.5 M), und PEG 6 000 (Endkonz.: 4 %) versetzt, 2 Std auf Eis stehen gelassen und schließlich abzentrifugiert (Sorvall GS3 Rotor, 7 000 Upm, 17 Min, 4 °C). Die sedimentierten Phagen wurden dann in 10 ml SM-Puffer vorsichtig suspendiert, in 50 ml Plastikröhrchen überführt und mit 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung wurde abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 5 000 Upm, 10 Min, 4 °C) und die wässrige Phase in einem neuen 50 ml Plastikröhrchen mit CsCl versetzt (Endkonz.: 0.75 g/ml). Die Lösung wurde dann in SW41 Polyallomerzentrifugenröhrchen überführt und 36 Stunden bei 30 000 Upm und 20 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die konzentrierte Phagenbande wurde durch seitliches Anstechen der Röhrchen gewonnen, und zweimal gegen 2 l 10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂ (pH 8.0) dialysiert. Die Proben wurden dann für 1 Std bei 65 °C mit Proteinase K behandelt (20 mM EDTA, pH 8.0, 50 µg/ml Proteinase K, 0.5 % SDS). Anschließend wurde der Ansatz mit Chloroform und Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert, wobei die Phasentrennung jeweils durch Zentrifugation (Heraeus Christ Minifuge GL, 5 000 Upm, 5 Min, 4 °C) erfolgte. Die DNA in der wässrigen Phase wurde mit Ethanol gefällt und in TE gelöst. Die auf diese Weise isolierten Phagen-DNA-Präparationen waren in allen Fällen Restriktionsanalysen und Subklonierungen zugänglich.

Verwendete Lösungen und Kulturmedien:

SM-Puffer:

- 5.8 g/l NaCl
- 2 g/l MgSO₄ × 7 H₂O
- 50 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5)
- 5 ml 2 % Gelatine
- autoklavieren

Tryptikase-Platten:

- 5 g/l NaCl
- 10 g/l Tryptikase
- 12 g/l Agar
- autoklavieren und in sterile Petrischalen gießen

Tryptikase-Weichagarose:

- 5 g/l NaCl
- 10 g/l Tryptikase
- 7 g/l Agar
- autoklavieren und im Wasserbad auf 45 °C abkühlen

NZ-Medium:

- 10 g/l NZ-amine
- 5 g/l NaCl
- 5 g/l Yeast-Extract
- 1 g/l Casamino-säuren
- 2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
- mit NaOH auf pH 7.5 einstellen und autoklavieren

6.33.2 Identifizierung und Isolierung positiv hybridisierender λ -Phagen aus einer λ gt11 Genbank

Aufgrund der Angaben des Herstellers, nämlich daß die Größe der Insertionen ca. 2 000 bp war und daß ca. 22 % der Klone Insertionen trugen, wurde die Anzahl der λ -Phagen, die 5 Genomäquivalenten entsprechen, als 150 000 berechnet. Deshalb wurden nach entsprechender Verdünnung der Genbank (Titer: $5 \cdot 10^9$ pfu/ml) in SM-Puffer 10 Ansätze mit je 10 μl Phagen-Verdünnung ($1.6 \cdot 10^3$ pfu/ μl) zusammen mit 200 μl *E. coli* Y1090 Zellen (Übernachtskultur) 15 Min bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mit 3 ml flüssiger Weichagarose gemischt, auf LB-Platten verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den bei 4 °C abgekühlten Platten wurden je zwei Nitrocellulose-Filter abgezogen (siehe Plaquehybridisierung) und unter Standardbedingungen hybridisiert. Sofern sich den Hybridisierungssignalen nicht eindeutig Plaques zuordnen ließen, wurde der entsprechende Bereich der Agarplatte ausgestochen und in SM-Puffer suspendiert. *E. coli* Y1090 Zellen wurden anschließend mit verschiedenen Phagenverdünnungen infiziert und über Nacht inkubiert. Durch erneute Plaquehybridisierung konnten so homogene, positiv hybridisierende λ -Klone identifiziert und isoliert werden (1 Plaque wird in 1 ml SM-Puffer mit 2 % Chloroform suspendiert).

Um aus den homogenen λ -Klonen DNA zu isolieren, wurden vier Ansätze à 200 μl *E. coli* Y1090 Zellen mit je 150 μl Phagen in SM-Puffer infiziert, Weichagarose zugesetzt, auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aufgrund des hohen Phagentiters entstanden fast konfluente "Plaquerasen", die jeweils mit 5 ml SM-Puffer überschichtet und 4 Std bei RT bewegt wurden. Der SM-Puffer wurde danach wieder abpipettiert, mit Chloroform versetzt (Endkonz.: 2 %) und abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge GL, 10

Min, 6 000 Upm, 4 °C), um Bakterienreste zu entfernen. Die weitere Aufreinigung der Phagen-DNA erfolgte nun genauso wie sie für λ EMBL3A-Phagen im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, jedoch mit der Ausnahme, daß keine weitere Phagenamplifizierung in Flüssigmedium erfolgte. Die mit Chloroform versetzte Phagensuspension wurde deshalb direkt nach der Amplifizierung auf den Platten mit DNase I und RNase A behandelt. Nach der erfolgten PEG-Präzipitation wurden die Phagen durch Zentrifugation konzentriert, abgezogen, dialysiert, mit Proteinase K behandelt und mit Chloroform extrahiert. Die DNA in der wässrigen Phase wurde mit Ethanol gefällt und in TE gelöst.

Verwendete Lösungen und Kulturmedien:

SM-Puffer:	5.8 g/l NaCl 2 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O 50 ml/l 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 5 ml/l 2 % Gelatine - autoklavieren
LB-Medium:	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Yeast-Extract 5 g/l NaCl 15 g/l Agar (nur für LB-Platten) - autoklavieren
Weichagarose:	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Yeast-Extract 5 g/l NaCl 8 g/l Agar - autoklavieren und auf 45 °C abkühlen lassen

6.34 Computeranalysen

Sämtliche Computeranalysen wurden am Rechenzentrum des Max-Planck-Instituts Martinsried mit einem Micro VAX Rechner von Digital Equipment Corp. durchgeführt.

DNA-Sequenzanalysen

Für DNA-Sequenzanalysen wurde das GAP, das MAP und das SEQED Programm des "University of Wisconsin Genetics Computer Group" (UWGCG) Programmpakets verwendet.

Aminosäuresequenzanalysen

Für Aminosäuresequenzvergleiche wurde das FastP-Programm (Lipman und Pearson, 1985) und das Relate-Programm (Dayhoff, 1979) des "Protein Identification Resource" (PIR) Programmpakets (George et al., 1986) verwendet.

Kurzbeschreibung der Programme

GAP:

Dieses Programm wurde hauptsächlich dazu benutzt, zwei DNA Sequenzen miteinander zu vergleichen, um homologe Bereiche zu identifizieren, oder um mögliche Kreuzhybridisierungen zwischen "mutagenen" Oligodeoxynukleotiden und Vektorsequenzen aufzuzeigen. Das Programm stellt homologe Bereiche beider Sequenzen über ihre gesamte Länge gegenüber, und zeigt durch Einfügen von Lücken ein Maximum an homologen Nukleotiden zwischen den beiden DNA Sequenzen. Das Programm arbeitet dabei mit dem von Needleman und Wunsch (1970) beschriebenen Algorithmus.

MAP:

Um Restriktionsschnittstellen, Restriktionsfragmentlängen, oder mögliche für Proteine kodierende Leserahmen zu bestimmen, wurde das MAP Programm verwendet. Es zeigt den DNA Doppelstrang, darüber die Restriktionsschnittstellen und darunter alle möglichen Leserahmen (Schroeder und Blattern, 1982).

SEQED:

SEQED bietet die Möglichkeit Nukleinsäuresequenzen einfach und schnell in den Computer einzugeben, sie dort zu kontrollieren, zu verändern und anderen Computeranalysen zugänglich zu machen.

7. LITERATUR

- Abelson, J. (1979). RNA processing and the intervening sequence problem. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 1035-1069.
- Aloni, Y., Dhar, R., Laub, O., Horowitz, M., and Khoury, G. (1977). Novel mechanism for RNA maturation: the leader sequences of simian virus 40 mRNA are not transcribed adjacent to the coding sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3686-3690.
- Ares Jr., M. (1986). U2 RNA from yeast is unexpectedly large and contains homology to vertebrate U4, U5, and U6 small nuclear RNAs. *Cell* **47**, 49-59.
- Astell, C. R., Ahlstrom-Jonasson, L., Smith, M., Tatchell, K., Nasmyth, B., and Hall, B. D. (1981). The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **27**, 15-23.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Benton, W.D., and Davis, R.W. (1977). Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* **196**, 180-182.
- Berget, S., Moore, C., and Sharp, P.A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3171-3175.
- Beyer, A.L., and Osheim, Y.N. (1988). Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes and Development* **2**, 754-765.
- Bindereif, A., and Green, M.R. (1987). An ordered pathway of snRNP binding during mammalian pre-mRNA splicing complex assembly. *EMBO J.* **6**, 2415-2424.
- Birnboim, C., and Doly, J. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Green, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., and Bayer, H.W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95-113.
- Botchan, M., Topp, W., and Sambrook, J. (1976). The arrangement of SV40 sequences in the DNA of transformed cells. *Cell* **9**, 269-287.
- Brack, C., and Tonegawa, S. (1977). Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5652-5656.
- Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F., and Chambon, P. (1978). Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4853-4857.
- Breeden L., and Nasmyth, K.A. (1987). Cell cycle regulation of *HO*: cis and trans acting regulators. *Cell* **48**, 389-397.

- Breitbart, R.E., Andreadis, A., and Nadal-Ginard, B. (1987). Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 467-495.
- Broach, J.R. (1982). The yeast plasmid 2 μ circle. *Cell* **28**, 203-204.
- Broach, J.R., Strathern, J.N., and Hicks, J.B. (1979). Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the *CAN1* gene. *Gene* **8**, 121-133.
- Brody, E., and Abelson, J. (1985). The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing dependent reaction. *Science* **228**, 963-967.
- Burke, J.M., and RajBhandary, U.L. (1982). Intron within the large rRNA gene of *N. crassa* mitochondria: a long open reading frame and a consensus sequence possibly important in splicing. *Cell* **31**, 509-520.
- Cavalier-Smith, T. (1978). Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selections for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J. Cell Sci.* **34**, 247-278.
- Cavalier-Smith, T. (1985). Selfish DNA and the origin of introns. *Nature* **315**, 283-284.
- Cech, T. (1986). The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell* **44**, 207-210.
- Cech, T.R., Zaugg, A.J., and Grabowski, P.J. (1981). In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: Involvement of a guanosin nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **27**, 487-496.
- Cellini, A., Felder, E., and Rossi, J.J. (1986a). Yeast pre-mRNA splicing efficiency depends on critical spacing requirements between the branch point and 3' splice site. *EMBO J.* **5**, 1023-1030.
- Cellini, A., Parker, R., McMahon, J., Guthrie, C., and Rossi, J. (1986b). Activation of a cryptic TACTAAC box in the *Saccharomyces cerevisiae* actin intron. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1571-1578.
- Chang, T.H., Clark, M.W., Lustig, A.J., Cusick, M.E., and Abelson, J. (1988). *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2379-2393.
- Chen, E.Y., and Seeburg, P.H. (1985). Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170.
- Cheng, S.-C., and Abelson, J. (1986). Fractionation and characterization of a yeast mRNA splicing extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2387-2391.
- Choffat, Y., Suter, B., Behra, R., and Kubli, E. (1988). Pseudouridine modification in the tRNA^{Tyr} anticodon is dependent on the presence, but independent of the size and sequence, of the intron in eucaryotic tRNA^{Tyr} genes. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3332-3337.
- Crick, F. (1979). Split genes and RNA splicing. *Science* **204**, 264-271.
- Cryer, D.R., Ecclesshall R., and Marmur, J. (1975). Isolation of Yeast DNA. In Prescott, D.M. (Ed.), *Methods in Cell Biology*, Vol. XII, Yeast Cells. Academic Press Inc., New York. S. 39-44.

- Darnell, J.E. (1978). Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eukaryotic cells. *Science* **202**, 1257-1260.
- Dayhoff, M.O. (1979). Survey of new data and computer methods of analysis. In M.O. Dayhoff (Ed.), *Atlas of protein sequence and structure*, Vol. 5, suppl. 3, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., S. 353-358.
- Doel, M.T., Houghton, M., Cook, E.A., and Carey, N.H. (1977). The presence of ovalbumin mRNA coding sequences in multiple restriction fragments of chicken DNA. *Nucleic Acids Res.* **4**, 3701-3713.
- Domdey, H., Apostol, B., Lin, R.-J., Newman, A., Brody, E., and Abelson, J. (1984). Lariat structures are in vivo intermediates in yeast pre-mRNA splicing. *Cell* **39**, 611-621.
- Doolittle, W.F. (1978). Genes in pieces: were they ever together? *Nature* **272**, 581-582.
- Dranginis, A.M. (1986). Regulation of cell type in yeast by the mating-type locus. *TIBS* **11**, 328-331.
- Duchêne, M., Löw, A., Schweizer, A., and Domdey, H. (1988). Molecular consequences of truncations of the first exon for in vitro splicing of yeast actin pre-mRNA. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7233-7239.
- Eperon, L.P., Graham, I., Griffiths, A.D., and Eperon I.C. (1988). Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing RNA Polymerase. *Cell* **54**, 393-401.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**, 266-267.
- Fink, G. (1987). Pseudogenes in yeast? *Cell* **49**, 5-6.
- Fouser, L.A., and Friesen, J.D. (1986). Mutations in a yeast intron demonstrate the importance of specific conserved nucleotides for the two stages of nuclear mRNA splicing. *Cell* **45**, 81-93.
- Fouser, L.A., and Friesen, J.D. (1987). Effects on mRNA splicing of mutations in the 3' region of the *Saccharomyces cerevisiae* actin intron. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 225-230.
- Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poustka, A., and Murray, N. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**, 827-842.
- Gallwitz, D. (1982). Construction of a yeast actin gene intron deletion mutant that is defective in splicing and leads to the accumulation of precursor RNA in transformed yeast cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 3493-3497.
- Gallwitz, D., Halfter, H., and Mertins, P. (1987). Splicing of mRNA precursors in yeast. In Kinghorn J.R. (Ed.), *Gene Structure in Eucaryotic Microbes*. SGM Special Publications 22, IRL Press, Oxford.
- George, D.G., Baker, W.C., and Hunt, L.T. (1986). The Protein Identification Resource (PIR). *Nucleic Acids Res.* **14**, 11-15.
- Gilbert, W. 1978. Why genes in pieces? *Nature* **276**, 501.

- Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T., and Tonegawa, S. (1983). A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* **33**, 717-728.
- Gordon, G.C., and McMaster, G.K. (1980). The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. *Methods Enzymol.* **65**, 380-391.
- Grunstein, M., and Hogness, D. (1975). Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3961-3965.
- Gruss, P., and Khoury, G. (1980). Rescue of a splicing defective mutant by insertion of an heterologous intron. *Nature* **286**, 634-637.
- Gruss, P., Lai, C.-J., Dhar, R., and Khoury, G. (1979). Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4317-4321.
- Guarente, L. (1987). Regulatory proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **21**, 425-452.
- Guarente, L., and Mason, T. (1983). Heme regulates transcription of the CYC 1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* **32**, 1279-1286.
- Haber, E.J., and Halvorson, H.O. (1975). Methods in Sporulation and Germination of Yeast. In Prescott, D.M. (Ed.), *Methods in Cell Biology*, Vol. XI, Yeast Cells. Academic Press Inc., New York. S. 46-70.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hartwell, L.H. (1967). Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J. Bacteriol.* **93**, 1662-1670.
- Hartwell, L.H. (1968). Temperature-sensitive mutants of yeast exhibiting a rapid inhibition of protein synthesis. *J. Bacteriol.* **96**, 1664-1671.
- Hartwell, L.H., McLaughlin, C.S., and Warner, J.R. (1970). Identification of ten genes that control ribosome formation in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **109**, 42-56.
- Heinrich, P. (1986). Guidelines for quick and simple plasmid sequencing. Molecular Biology, Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica.
- Herskowitz, I. (1987). A master regulatory locus that determines cell specialization in yeast. *The Harvey Lectures* **81**, 67-92.
- Hicks, J.B., and Herskowitz, I. (1976). Interconversion of yeast mating types. Direct observation of the action of the homothallism (*HO*) gene. *Genetics* **85**, 245-258.
- Hicks, J.B., and Herskowitz, I. (1977). Interconversion of yeast mating types. II. Restoration of mating ability to sterile mutants in homothallic and heterothallic strains. *Genetics* **85**, 373-393.
- Hinnen, A., Hicks, J.B., and Fink, G.R. (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929-1933.

- Hiroaka, Y., Toda, T., and Yanagida, M. (1984). The *NDA3* gene of fission yeast encodes β -tubuline: A cold-sensitive *nda3* mutation reversibly blocks spindle formation and chromosome movement in mitosis. *Cell* **39**, 349-358.
- Hawthorne, D.C. (1963). A deletion in yeast and its bearing on the structure of the mating type locus. *Genetics* **48**, 1727-1729.
- Hawthorne, D.C. (1963). Directed mutation of the mating type alleles as an explanation of homothallism in yeast. *Abstr. Proc. 11th Int. Congr. Genet.* **7**, 34-35.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Jacquier, A., and Duyon, B. (1985). An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* **41**, 383-394.
- Jeffreys, A.J., and Flavell, R.A. (1977). The rabbit β -globin gene contains a large insert in the coding sequence. *Cell* **12**, 1097-1108.
- Jensen, R., Sprague, Jr., G.F., and Herskowitz, I. (1983). Regulation of yeast mating-type interconversion: Feedback control of the *HO* gene expression by the mating-type locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3035-3039.
- Johnson, A.D., and Herskowitz, I. (1985). A repressor (*MAT α 2* product) and its operator control expression of a set of cell type specific genes in yeast. *Cell* **42**, 237-247.
- Johnson, P., and Abelson, J. (1983). The yeast tRNA^{Tyr} gene intron is essential for correct modification of its tRNA product. *Nature* **302**, 681-687.
- Khandjian, E.W. (1986). UV crosslinking of RNA to nylon membrane enhances hybridization signals. *Mol. Biol. Rep.* **11**, 107-115.
- Klar, A.J., Strathern, J.N., Broach, J.B., and Hicks, J.B. (1981). Regulation of transcription in expressed and unexpressed mating type cassettes of yeast. *Nature* **289**, 239-244.
- Klinz, F., and Gallwitz, D. (1985). Size and positioning of intervening sequences are critical for the splicing efficiency of pre-mRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **13**, 3791-3804.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**, 509-517.
- Kostriken, R., and Heffron, F. (1984). The product of the *HO*-Gen is a nuclease. Purification and characterization of the enzyme. *CSH Symp. Quant. Biol.* **49**, 89-96.
- Kostriken, R., Strathern, J.N., Klar, A.J.S., Hicks, J.B., and Heffron, F. (1983). A site specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **35**, 167-174.

- Kramer, W., and Fritz, H.-J. (1987). Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA. In Wu, R. and Grossman, L. (Eds.). *Methods Enzymol.* **154**, 350-367.
- Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H., Kramer, B., Pflugfelder, M., and Fritz, H.-J. (1984). The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* **12**, 9441-9456.
- Kretzner, L., Rymond, B.C., and Rosbash, M. (1987). *Saccharomyces cerevisiae* U1 RNA is large and has limited primary sequence homology to metazoan U1 snRNA. *Cell* **50**, 593-602.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., and Cech, T.R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell* **31**, 147-157.
- Kunkel, T.A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492.
- Langford, C.J., and Gallwitz, D. (1983). Evidence for an intron-contained sequence required for the splicing of yeast RNA polymerase II transcripts. *Cell* **33**, 519-527.
- Langford, C.J., Klinz, F.-J., Donath, C., and Gallwitz, D. (1984). Point mutations identify the conserved, intron-contained TACTAAC box as an essential splicing signal sequence in yeast. *Cell* **36**, 645-653.
- Laski, F.A., Rio, D.C., and Rubin, G.M. (1986). Tissue specificity of drosophila P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* **44**, 7-19.
- Leer, R.J., Van Raamsdonk-Duin, M.M.C., Mager, W.H., and Planta, R.J. (1985). Conserved sequences upstream of ribosomal protein genes. *Current Genetics* **9**, 273-277.
- Lehmeier, T. (1986). Isolierung und Strukturaufklärung eines ras-verwandten Gens der Hefe *Schizosaccharomyces pombe*. Diplomarbeit, Universität Marburg.
- Lin, R.-J., Newman, A.J., Cheng, S.-C., and Abelson, J. (1985). Yeast mRNA splicing in vitro. *J. Biol. Chem.* **260**, 14780-14792.
- Lindgren, C.C., and Lindgren, G. (1943). A new method for hybridizing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **29**, 306.
- Lipman, D.J., and Pearson, W.R. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **227**, 1435-1441.
- Lustig, A., Lin, R.-J., and Abelson, J. (1986). The yeast RNA gene products are essential for mRNA splicing in vitro. *Cell* **47**, 953-963.
- MacKay, V.M., and Manney, T.R. (1974a). Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and phenotypic characterization of nonmating mutants. *Genetics* **76**, 255-271.
- MacKay, V.M., and Manney, T.R. (1974b). Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic analysis of nonmating mutants. *Genetics* **76**, 273-288.

- Macreadie, I.G., Scott, R.M., Zinn, A.H., and Butow, R.A. (1985). Transposition of an intron in yeast mitochondria requires a protein encoded by that intron. *Cell* **41**, 395-401.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Maniatis, T., Jeffrey, A., Kleid, D.G. (1975). Nucleotide sequence of the rightward operator of Phage λ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1184-1188.
- Manley, J.L., Noble, J.C.S., Fu, X-Y., and Ge, H. Factors that influence alternative splice site selection in vitro. In Inouye, M., Dudock, B.S. (Eds.). *Molecular Biology of RNA: New Perspectives*. (1987) 79-112.
- Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. In Grossman, L. and Moldave, K. (Eds.). *Methods Enzymol.* **65**, 499-560.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M.R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7035-7056.
- Messing, J. (1979). A multiple cloning system based on the single stranded DNA bacteriophage M13. *Recombinant DNA Technical Bulletin* **2**, 43-48.
- Messing, J. (1983). New M13 vectors for cloning. In Wu, R., Grossman, L., and Moldave, K. (Eds.). *Methods Enzymol.* **101**, 20-78.
- Michel, F., and Dujon, B. (1983). Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members. *EMBO J.* **2**, 33-38.
- Miller, A.M. (1984). The yeast *MATa1* gene contains two introns. *EMBO J.* **3**, 1061-1065.
- Miller, A.M., MacKay, V.L., and Nasmyth, K.A. (1985). Identification and comparison of two sequence elements that confer cell-type specific transcription in yeast. *Nature* **314**, 598-603.
- Morrison, D. A. (1979). Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing. In Wu, R. (Ed.). *Methods in Enzymology* **68**, 326-331, Academic Press, New York.
- Mortimer, R.K., and Hawthorne, D.C. (1968). Genetic mapping in *Saccharomyces*. *Genetics* **53**, 165-173.
- Mortimer, R.K., and Hawthorne, D.C. (1969). Yeast genetics. In Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds.). *The Yeasts*, Vol. 1, Academic Press, New York. S. 385-460.
- Mount, S.M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic. Acids Res.* **10**, 459-472.
- Nasmyth, K.A., and Shore, D. (1987). Transcriptional regulation in the yeast life cycle. *Science* **237**, 1162-1170.
- Nasmyth, K.A., Tatchell, K., Hall, B.D., Astell, C.R., and Smith, M. (1981a). A position effect in the control of transcription at yeast mating type loci. *Nature* **289**, 244-250.

- Nasmyth, K.A. (1982). Molecular genetics of yeast mating type. *Ann. Rev. Genet.* **16**, 439-500.
- Nasmyth, K.A. (1983). Molecular analysis of a cell lineage. *Nature* **302**, 670-676.
- Nasmyth, K.A. (1985a). A repetitive DNA sequence that confers cell-cycle START (*cdc28*)-dependent transcription of the *HO* gene in yeast. *Cell* **42**, 225-235.
- Nasmyth, K.A. (1985b). At least 1400 base pairs of 5'-flanking DNA is required for correct expression of the *HO* gene in yeast. *Cell* **42**, 213-223.
- Nasmyth, K.A. (1987). The determination of mother cell specific mating type switching in yeast by a specific regulation of *HO* transcription. *EMBO J.* **6**, 243-248.
- Nasmyth, K.A., Stillman, D., and Kipling, D. (1987). Both positive and negative regulators of *HO* transcription are required for mother-cell-specific mating-type switching in yeast. *Cell* **48**, 579-587.
- Nasmyth, K.A., Tatchell, K., Hall, B.D., Astell, C., and Smith, M. (1981b). A physical analysis of mating type loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**, 961-981.
- Needleman, S.B., and Wunsch, C.D. (1979). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**, 443-453.
- Newman, A.J., Ogden, R.C., and Abelson, J. (1983). tRNA gene transcription in yeast: effects of specific base substitutions in the intragenic promotor. *Cell* **35**, 117-125.
- Newman, A. (1987). Specific accessory sequences in *Saccharomyces cerevisiae* introns control assembly of pre-mRNAs into spliceosomes. *EMBO J.* **6**, 3833-3839.
- Newman, A.J., Lin, R.-J., Cheng, S.-C., and Abelson, J. (1985). Molecular consequences of specific intron mutations on yeast mRNA splicing in vivo and in vitro. *Cell* **42**, 335-344.
- Nomiyama, H., Kuhara, S., Kukita, T., Otsuka, T., and Sakaki, Y. (1981). Nucleotide sequence of the ribosomal RNA gene of *Physarum polycephalum*: intron 2 and its flanking regions of the 26S rRNA gene. *Nucleic Acids Res.* **9**, 5507-5520.
- Olson, M.V., Montgomery, D.L., Hopper, A.K., Page, G.S., Horodyski, F., and Hall, B.D. (1977). Molecular characterization of the tyrosine tRNA genes of yeast. *Nature* **267**, 639-641.
- Pabo, C.O., and Sauer, R.T. (1984). Protein-DNA recognition. In Richardson, C., Boyer, P.D., and Meister, A. (Eds.). *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 293-321.
- Parker, R. (1985) Ph.D. Thesis, University of California at San Francisco.
- Parker, R., and Patterson, B. Architecture of fungal introns: Implications for spliceosome assembly. In Inouye, M. and Dudock, B.S. (Eds.). *Molecular Biology of RNA: New Perspectives.* (1987) 133-149.
- Parker, R., and Guthrie, C. (1985). A point mutation in the conserved hexanucleotide at a yeast 5' splice junction uncouples recognition, cleavage, and ligation. *Cell* **41**, 107-118.
- Parker, R., Siliciano, P.G., and Guthrie, C. (1987). Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves basepairing to the U2-like snRNA. *Cell* **49**, 229-239.

- Patel, R.S., Odermatt, E., Schwarzbauer, J.E., and Hynes, R.O. (1987). Organization of the fibronectin gene provides evidence for exon shuffling during evolution. *EMBO J.* **6**, 2565-2573.
- Pikielny, C.W., and Rosbash, M. (1986). mRNA splicing efficiency in yeast and the contribution of nonconserved sequences. *Cell* **41**, 119-126.
- Pikielny, C.W., Rymond, B.C., and Rosbash, M. (1986). Electrophoresis of ribonucleoproteins reveals an ordered assembly pathway of yeast splicing complexes. *Nature* **324**, 341-345.
- Pikielny, C.W., Teem, J.L., and Rosbash, M. (1983). Evidence for the biochemical role of an internal sequence for yeast nuclear mRNA introns: implications for U1 RNA and metazoan mRNA splicing. *Cell* **34**, 395-403.
- Rothstein, R.J., Esposito, R.E., and Esposito, M.S. (1977). The effect of ochre suppression on meiosis and ascospore formation in *Saccharomyces*. *Genetics* **85**, 35-54.
- Rudolph, H., Koenig-Rauseo, I., and Hinnen, A. (1985). One step gene replacement in yeast by cotransformation. *Gene* **36**, 87-95.
- Rymond, B.C., and Rosbash, M. (1985). Cleavage of 5' splice site and lariat formation are independent of 3' splice site in yeast mRNA splicing. *Nature* **317**, 735-737.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schroeder, J.L., and Blattner, F.R. (1982). Formal description of a DNA orientated computer language. *Nucleic Acids Res.* **10**, 69-84.
- Serafin, B., Kretzner, L., and Rosbash, M. (1988). A U1 snRNA:pre-mRNA base pairing interaction is required early in yeast spliceosome assembly but does not uniquely define the 5' cleavage site. *EMBO J.* **7**, 2533-2538.
- Sharp, P.A. (1985). On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* **42**, 397-400.
- Shepherd, J.C.W., McGinnis, W., Carrasco, A.E., DeRobertis, E.M., and Gehring, W. (1984). Fly and frog homeo domains show homologies with the mating type regulatory proteins. *Nature* **310**, 70-71.
- Sherman, F. (1975). Use of micromanipulators in yeast studies. In Prescott, D.M. (Ed.), *Methods in Cell Biology*, Vol. XI, Yeast Cells. Academic Press Inc., New York. S. 189-200.
- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J.B. (1983). *Methods in Yeast Genetics: Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, S.119.
- Siliciano, P.G., and Guthrie, C. 5' Splice site selection in yeast: Genetic alterations in base pairing with U1 reveal additional requirements. *Genes and Development* (in press).
- Siliciano, P.G., Brow, D., Roiha, H., and Guthrie, C. (1987a). An essential snRNA from *Saccharomyces cerevisiae* has properties predicted for U4, including interaction with the U6-like snRNA. *Cell* **50**, 585-592.
- Siliciano, P.G., Jones, M.H., and Guthrie, C. (1987b). *Saccharomyces cerevisiae* has a U1-like small nuclear RNA with unexpected properties. *Science* **237**, 1484-1487.

- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Sternberg, P.W., Stern, M.J., Clark, I., and Herskowitz, I. (1987). Activation of the yeast *HO* gene by release from multiple negative controls. *Cell* **48**, 567-577.
- Strathern, J., Hicks, J., and Herskowitz, I. (1981). Control of cell type in yeast by the mating type locus. The $a1/\alpha2$ hypothesis. *J. Mol. Biol.* **147**, 357-372.
- Strathern, J.N., and Herskowitz, I. (1979). Asymmetry and directionality in production of new cell types during clonal growth: the switching pattern of homothallic yeast. *Cell* **17**, 371-381.
- Sudhof, T.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Russell, D.W. (1985a). The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* **228**, 815-822.
- Sudhof, T.C., Russell, D.W., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1985b). Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science* **228**, 893-895.
- Takano, I., and Oshima, Y. (1970). Mutational nature of an allele-specific conversion of the mating type by the homothallic gene *HO α* in *Saccharomyces*. *Genetics* **65**, 421-427.
- Tatchell, K., Nasmyth, K.A., Hall, D., Astell, C., and Smith, M. (1981). In vitro mutation analysis of the mating type locus in yeast. *Cell* **27**, 25-35.
- Teem, J.L., Abovich, N., K  ufer, N.F., Schwindinger, W.F., Warner, J.R., Levy, A., Woolford, J., Leer, R.J., van Raamsdonk-Duin, M.M.C., Mager, W.H., Planta, R.J., Schultz, L., Friesen, J.D., Fried, H., and Rosbash, M. (1984). A comparison of yeast ribosomal protein gene DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **12**, 8295-8312.
- Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5201-5205.
- Toda, T., Adachi, Y., Hiroaka, Y., and Yanagida, M. (1984). Identification of the pleiotropic cell division cycle gene *NDA2* as one of two different α -tubuline genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell* **37**, 233-242.
- van der Horst, G., and Tabak, H.F. (1985). Self splicing of yeast mitochondrial ribosomal and messenger RNA precursors. *Cell* **40**, 759-766.
- Viera, J., and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
- Vijayraghavan, U., Parker, R., Tamm, J., Iimura, Y., Rossi, J., Abelson, J., and Guthrie, C. (1986). Mutations in conserved intron sequences affect multiple steps in the yeast splicing pathway, particularly assembly of the spliceosome. *EMBO J.* **5**, 1683-1695.
- Wallace, R.B., Johnson, P.F., Tanaka, S., Sch  ld, M., Itakura, K., and Abelson, J. (1980). Directed deletion of a yeast transfer RNA intervening sequence. *Science* **209**, 1396-1400.
- Wilimzig, M. (1985). LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. *Trends in Genetics* **1**, 158.

- Winge, O. (1935). On haplophase and diplophase in some *Saccharomyces*. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol.* **21**, 77.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Young, R.A., and R.W. Davis (1983). Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. *Science* **222**, 778-782.
- Zuker, M., and Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* **9**, 133-148.

8. ANHANG

Identifizierung und Charakterisierung von RNA-Sequenzen, die mit den *MATa1* spezifischen Oligodeoxynukleotiden E2 und E3 kreuzhybridisieren

Die in dieser Arbeit beschriebenen *in vivo* Spleißanalysen mittels reverser Transkription zeigten häufig neben den erwarteten Transkripten weitere für das *MATa1* Gen nicht-spezifische cDNA Transkripte (vgl. Abb. 18, 19, 22). Da es sich um Signale definierter Länge handelte, lag es nahe zu vermuten, daß es sich dabei um keine unspezifischen Hybridisierungen an viele verschiedene RNA Spezies handelte. Viel wahrscheinlicher war, daß es sich um konkrete Kreuzhybridisierungen zu bestimmten RNAs handelte. Im folgenden werden deshalb Untersuchungen beschrieben, die klären sollten, woher diese nicht *MATa1* -spezifischen cDNA Transkripte stammten.

8.1 RNA-Sequenzierung mit den Oligodeoxynukleotiden E2 und E3

Die kreuzhybridisierenden RNA-Spezies sollten durch direkte RNA-Sequenzierung mit den Oligodeoxynukleotiden E2 und E3 identifiziert werden. Die Analysen durch reverse Transkription hatten bereits gezeigt, daß die *MATa1* spezifischen Primer an die fremden RNA-Spezies hybridisieren können, und damit komplementäre DNA synthetisiert werden kann. Wesentlich spezifischer für die Sequenzierung der fremden RNA konnte die Sequenzreaktion dadurch gestaltet werden, daß Gesamt-RNA aus *MAT α* Hefezellen als Matrize verwendet wurde. In Gesamt-RNA aus *MAT α* Zellen ist keine *MATa1* RNA vorhanden und somit können die Oligodeoxynukleotide E2 und E3 jeweils nur an die kreuzhybridisierende RNA binden.

Aus diesem Grund wurden je 50 µg Gesamt-RNA aus dem Hefestamm KN79 für die Sequenzreaktionen mit den 5'-[³²P]-markierten Oligodeoxynukleotiden E2 und E3 als Primer verwendet. In Abb. 25 sind die Autoradiogramme der Sequenzgele gezeigt.

Die RNA-Sequenzanalyse mit dem Oligodeoxynukleotid E3 als Primer lieferte eine klar zu identifizierende, wenn auch relativ kurze Sequenzfolge (SEQE3, 27 Nukleotide), die parallel zum Autoradiogramm von unten nach oben in 5' - 3' Richtung angegeben ist (Abb. 25B). Wurde das Oligodeoxynukleotid E2 als Primer verwendet, so ergab sich zwar ebenfalls eine definierte RNA-Sequenz, die jedoch von mindestens einer weiteren schwächeren Sequenz überlagert war. Trotzdem konnte eine 50 Nukleotide lange Sequenzfolge (SEQE2) abgelesen werden (Abb. 25A).

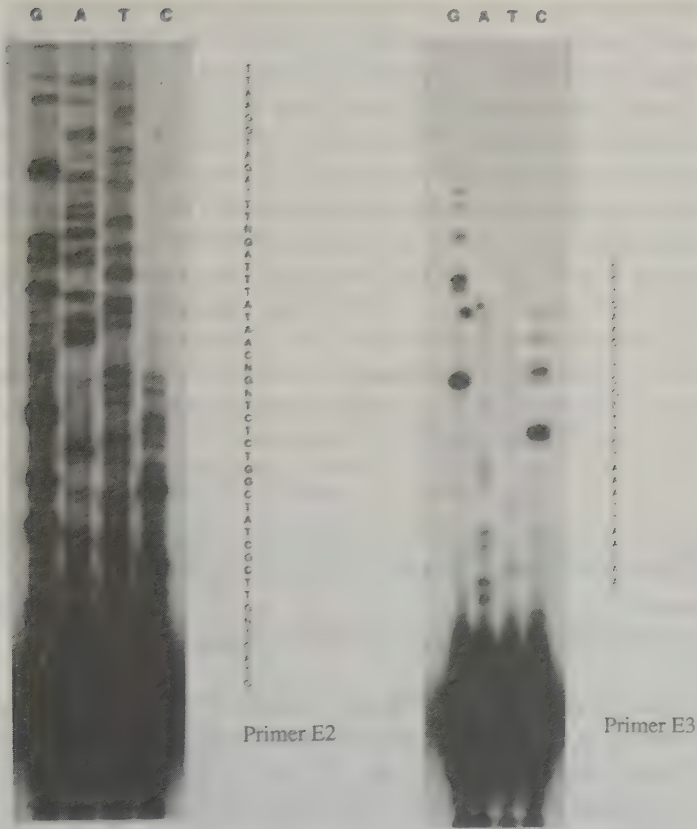


Abb. 25: RNA-Sequenzierung mit den Oligodeoxynukleotiden E2 und E3

Für die RNA-Sequenzierung wurde pro Reaktion 50 µg Gesamt-RNA aus *MATα* Hefezellen (KN79) verwendet. Die Sequenzreaktionen wurden mit den *MATα* spezifischen, 5'-[³²P]-markierten Oligodeoxynukleotiden E2 (A) bzw. E3 (B) durchgeführt, auf 12 % Polyacrylamid / 8 M Harnstoffgelen aufgetrennt und 16 Std exponiert. Parallel zur Sequenzleiter ist jeweils die abgelesenen Nukleotidfolge von unten nach oben in 5' - 3' Richtung angegeben.

8.2 Sequenzvergleiche mit einer Nukleinsäure-Datenbank

Durch den Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit einer Nukleinsäure-Datenbank sollte im folgenden geklärt werden, ob die diesen RNAs entsprechenden Gene bekannt waren und falls dies der Fall war, um welche Gene es sich handelte. Deshalb wurde eine Nukleinsäure-Datenbank (Genbank) unter Verwendung des Programmes "Wordsearch", aus dem

"UWGGC"-Paket, nach homologen Sequenzen abgefragt. Bei der Suche mit der Sequenz SEQE2 wurde unter anderem die 25S ribosomale RNA von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces carlsbergensis* gefunden. Das Ergebnis dieser Computeranalyse ist in Abb. 26 teilweise abgebildet und zeigt, daß die Sequenz von SEQE2 zu 100 % homolog zur 25S rRNA von *Saccharomyces cerevisiae* ist. Ein in Abb. 26B gezeigter direkter Vergleich beider Sequenzen ("GAP-Programm") macht auch klar, an welcher Stelle der 25S rRNA das Oligodeoxynukleotid E2 hybridisieren konnte, denn zumindest sieben Nukleotide am 3' Ende von E2 waren völlig komplementär zu den Positionen 474 bis 480 der 25S rRNA.

Der Datenbankvergleich mit SEQE3 ergab, daß diese Sequenz zu keiner bisher beschriebenen Nukleinsäuresequenz starke Homologien aufwies. Um näheres über diese mit dem Oligodeoxynukleotid E3 hybridisierende RNA zu erfahren, sollte das entsprechende Gen kloniert und auf DNA-Ebene sequenziert werden. Falls es sich um ein für ein Protein kodierendes Gen handeln sollte, waren Computeranalysen auf Aminosäureebene geplant, die vielleicht auch eine Klassifizierung des Gens ermöglichen.

8.3 Klonierung und Charakterisierung eines Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* mit Sequenzhomologie zum ribosomalen Protein S1 aus *Xenopus laevis*

8.3.1 Identifizierung und Isolierung genomischer λ -Klone

Die RNA-Sequenzanalyse mit dem Oligodeoxynukleotid E3 lieferte die Information zur Synthese eines neuen 27 Nukleotide langen Oligodeoxynukleotides (SEQE3), das nun völlig komplementär und spezifisch für das gesuchte Gen war. Mit dieser neuen 5'-[³²P] markierten Probe (SEQE3) wurde in einer käuflich erworbenen genomischen Hefegenbank (λ gt11) nach positiv hybridisierenden Phagen gesucht. Etwa 160 000 Phagenplaques ($\approx$ 5 Genomäquivalente) wurden mit $30 \cdot 10^6$ cpm Oligodeoxynukleotid SEQE3 (spez. Aktivität: $6 \cdot 10^6$ cpm/pMol) hybridisiert und stringent gewaschen ($6 \times$ SSC / 0.1 % SDS, 15 Min, 60 °C). Nach einer Exposition für 16 Std waren zwei positive Signale zu erkennen. Nach zwei weiteren Selektionsrunden lagen zwei homogene, positiv hybridisierende Phagenpopulationen vor. Aus beiden λ gt11 Klonen wurde DNA isoliert und mit EcoRI geschnitten, um die Größe der Insertionen zu bestimmen. Da beide Phagenplaques eine etwa 700 bp große Insertion trugen, wurde nur ein Fragment über ein "Low Melting Point"-Agarosegel isoliert und mit einem mit EcoRI linearisierten pUC13 verknüpft (pEco). Aufgrund der unten in Abschnitt 8.3.3 beschriebenen Northernblotanalysen war klar, daß dieses 700 bp große Fragment auf keinen Fall das gesamte gesuchte Gen tragen konnte. Deshalb wurde das 700 bp Fragment nach der "random hexamer labeling"-Methode radioaktiv markiert und als Probe für eine weitere Suche in einer anderen Genbank verwendet. Diesmal wurde eine von Michael Duchêne (Genzentrum, München) hergestellte

genomische Hefegenbank in λ EMBL3A-Phagen verwendet, von der bereits bekannt war, daß sie Insertionen von etwa 14 - 20 Kbp Länge enthält. Etwa 10 000 Phagenplaques ($\approx$ 5 Genomäquivalente) wurden mit der 700 bp langen Probe hybridisiert und stringent gewaschen (0.1 x SSC / 0.1 % SDS, 30 Min, 65 °C). Dadurch konnten drei positiv hybridisierende λ -Klone identifiziert werden. Zwei davon wurden durch Southernanalysen näher charakterisiert, und aus einem Klon wurden schließlich zwei mit dem 700 bp Fragment hybridisierende Restriktionsfragmente (ein 3.5 Kbp HindIII Fragment, ein 1 Kbp EcoRI Fragment) in pUC18 subkloniert (siehe Abb. 27).

A

(BestFit) SEGMENTS from: SEQE2.wor;2 December 3, 1987 20:01

(Masked) (Nucleotide) WORDSEARCH: Disk\$Public:[Koehrer]SEQE2.Dat check: 86
85 from: 1 to: 51

SEQUENZ ERHALTEN DURCH RNA-SEQUENZIERUNG MIT E2 TO: GENBANK:* Sequences:
14023 Total-length: 14855145 December 3, 1987 18:41

Mask: "++-++-++"

Word-size: 8 Words: 3166848 Diagonals: 168048 Total-diagonals: 31112590
AvMatch: 0.38 AvMismatch: -0.60 GapWeight: 4.00 LengthWeight: 0.10 ..

```
SEOE2.Dat          check: 8685  from: 1      to: 51      /Reverse
```

Genbank:Ysgrg26a check: 2608 from: 617 to: 3973

Yeast (*s.carlsbergensis*) 5.8s (3' end) and 26s rrna genes and intergenic region.

Gaps: 0 Quality: 46.0 Ratio: 0.920 Score: 38 Width: 3 Limits: +/-4

50 AATTCCATCTAAANCTAAATATTGNCNAGAGACCGATAGCGAACNAGTAC 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	5
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

619 AATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAGTAC 668

SEQE2.Dat check: 8685 from: 1 to: 51 /Reverse

Genbank:Yscrgih5 check: 5736 from: 417 to: 3911

Yeast (*s.cerevisiae*) 25s rrna gene & flanks. 1/85

Gaps: 0 Quality: 46.0 Ratio: 0.920 Score: 38 Width: 3 Limits: +/-4

50 AATTCCATCTAAANCTAAATATTGNCNAGAGACCGATAGCGAACNAGTAC 1

[illegible]

419 AATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC 468

B

GAP of: SEQE2.Dat check: 8685 from: 1 to: 51

SEQUENZ ERHALTEN DURCH RNA-SEQUENZIERUNG MIT E2

to reverse of: Ys rgi5.Genbank check: 5736 from: 1 to: 3911

LOCUS: YSCRG1H5, 3911 bp,DNA updated 01/07/85

DEFINITION Yeast (*s.cerevisiae*) 25s rrna gene & flanks.

ACCESSION J01355

KEYWORDS 25S ribosomal RNA; ribosomal RNA.

SEGMENT 5 of 5

Symbol comparison table: GenDataBase:NWSGapDNA.Cmp CompCheck: 6876

Gap Weight: 5.000 Average Match: 1.000

Length Weight: 0.300 Average Mismatch: 0.000

Quality: 50.0 Length: 3911

Ratio: 0.980 Gaps: 0

Percent Similarity: 98.039

Seqkk5.Dat x Yscrgih5.Genbank December 3, 1987 20:11

```

1 .....GTACTNG 7
                xxxxxxxx |||||
511 TTTTCTACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTG 462

8 TTCGCTATCGGTCTCTNGNCAATATTTAGNTTTAGATGGAATTA..... 51
  |||||
461 TTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACC 412
  
```

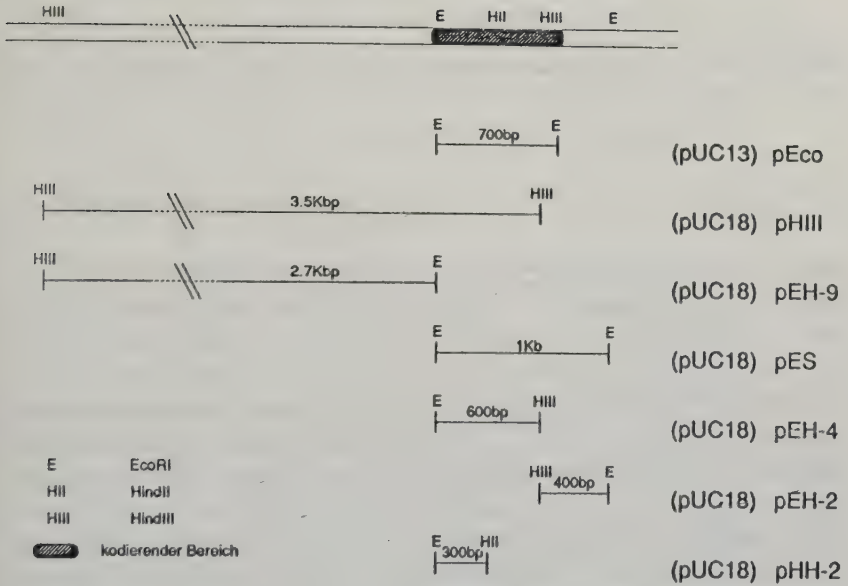
Abb. 26: Vergleich der RNA-Sequenz SEQE2 mit einer Nukleinsäuredatenbank

Die 50 Nukleotide lange RNA-Sequenz (SEQE2) wurde mit Hilfe des "Wordsearch"-Programms mit einer Nukleinsäuredatenbank (Genbank) verglichen. Die Parameter der Suche, sowie die gefundenen Sequenzen mit den besten Homologien sind in A abgedruckt. B zeigt einen direkten Sequenzvergleich ("Gap"-Programm) zwischen der Sequenz SEQE2 und der 25 S ribosomalen RNA von *Saccharomyces cerevisiae*. Die mit einem 'x' gekennzeichneten Nukleotide der 25S ribosomalen RNA sind völlig komplementär zum 3' Ende des MATa1 spezifischen Oligodeoxynukleotids E2.

8.3.2 DNA-Sequenzanalyse des Gens und der flankierenden Regionen

Die Bestimmung der Primärstruktur des Gens erfolgte durch Sequenzierung überlappender Klone. Die Sequenzreaktionen wurden dabei jeweils von beiden Seiten mit dem pUC-Vorwärts- bzw. pUC-Rückwärtsprimer gestartet. Ein Bereich in der kodierenden Region und der 5' nicht-transkribierte Bereich wurden zusätzlich mit speziell dafür synthetisierten Oligodeoxynukleotiden (Rib1, Rib2, Rib3, Rib4, Rib5) sequenziert. Die in Abb. 27B gezeigte DNA-Sequenz des Gens beruht auf der Sequenzierung beider Stränge, mit Ausnahme des 5' nicht-transkribierten Bereichs, von dem nur ein Strang sequenziert wurde. Abb. 27A zeigt die Größe und Orientierung der Subklone.

A



B

1 AAAAGTCTCTCTCTTTTTTTCACGTCTGcGGCTGATGTAAGCAGCAGGACATGGCAGGAA
 61 GAAAATCGGAGAATTTGTGGCcGCGACACCTGACAAACAATCCTCAGGCAAATGTAAAATT
 121 GTACATGAAAGGcNgNGTAGTCAATGTCTTAGAAGGcCGGCCCGCATGATCCAGAAGCAG
 181 ACCATAAAAAAATAAAATTCGCGGTCTGGCAGCAGGCATAAGATGCATAGCGTTATCCT
 241 AAATGACATCACGATGATAAATCCTCCGCcGCATGATGCTTTTGATTcCTAAGGGCCTG
 301 CCATCGTGCTGGCTCAAACATATGAGGGTCAACATACCTTGAAAAATCCAAGTAAAAGGATG
 361 GATATCGTTATACTAAAGCAACACAGAAAAGGTCCACGTGAGTCCACACAATAACATTT
 421 ACGTAGTGTTACGCGAAGCAGTTACATCTCAACTAACATAATTGCTGGTGAGCCTACAA
 481 CACTGCATGCGTAAACGTCAACGGGATTACGTTAGTATTTTTGGCCGCCGGTAAATTCTC
 541 TTGTTTTTTTTCTTGATTTCACCTCTTTTCATGTTCCCTTGAGATAATCTAATTCCTCAT
 601 GATTAAATGAGACTGTTTTTTGTTTCCGTAACATCCAATACCTTTGGTGTATAATATTCT
 661 TGCTGTAAAGTTTGTTTTTTTTATGAAAAAACATTTCTTTTCTTGAGATGAGGCGCCG

721 CGAGCCTTTCTCCCATCCCGAGTGGTAAATTTTCCAAATCAATGCAGCTCTTTGAAATAC
 781 AACAGCATTTTTCATACATTTTAAGCAATTTCTAGTTTGTAGATATTGTTAGATTAGTTT
 841 TTGAACATTGTTTTGATAACTGAAAATAAAACAGCAAAACAACTACAAAATGGTCGCTT
 M V A L -
 901 TAATCTCTAAGAAAAGAAAGCTAGTGGCTGACGGTGTCTTCTACGCTGAATTGAACgaat
 I S K K R K L V A D G V F Y A E L N E F -
 961 tcTTCACCAGAGAATTAGCTGAAGAAGGTTACTCCGGTGTTGAAGTCCGTGTCCTCCAA
 F T R E L A E E G Y S G V E V R V T P T -
 1021 CCAAGACCGAAGTTATCATCAGAGCTACCAGAACTCAAGATGTTTTGGGTGAAAACGGTA
 K T E V I I R A T R T Q D V L G E N G R -
 1081 GAAGAATCAACGAATTAACTTTGTGGTTCAAAAGAGATTCAAGTACGCTCCAGGTACTA
 R I N E L T L L V Q K R F K Y A P G T I -
 1141 TTGTCTTATATGCTGAAAGAGTTCAAGACCGTGGTTTGTCCGGTGTGCTCAAGCTGAAT
 V L Y A E R V Q D R G L S G V A Q A E S -
 1201 CTATGAAATTCAAATTTGTTGAACGGTTTGGCTATCAGAAGAGCTGCTTACGGTGTGCTCA
 M K F K L L N G L A I R R A A Y G V V R -
 1261 GATACGTTATGAATCTGGTGCTAAGGGTTGTGAAGTTGTTGTTTCCGGTAAACTAAGAG
 Y V M E S G A K G C E V V V S G K L R A -
 1321 CTGCCAGAGCTAAGGCTATGAAATTTGCTGACGGTTTCTTGATTCACTCTGGTCAACCAG
 A R A K A M K F A D G F L I H S G Q P V -
 1381 TCAACGACTTCATTGACACTGCTACTAGACACGCTCTTGATGAGACAAGGTGTTTTGGGTA
 N D F I D T A T R H V L M R Q G V L G I -
 1441 TCAAGGTTAAGATTATGAGAGACCCAGCTAAGAGCAGAAGTGGTCCAAAGGCTTTGCCAG
 K V K I M R D P A K S R T G P K A L P D -
 1501 ATGCTGTCAACATCATTGAACCAAAAGAAGAAGAACCAATTCTTGCTCCATCTGTCAAGG
 A V T I I E P K E E E P I L A P S V K D -
 1561 ACTACAGACCAGCTGAAGAAACTGAAGCTCAAGCTGAACCAAGTTGAAGCTTAGATTTAAT
 Y R P A E E T E A Q A E P V E A *
 1621 TATTAAATACATAAATAAACTATAAGTACAATAATTTCTTCTATTCTAGTGCCTTAATT
 1681 CTTGCGGTTTCTTGCATATTGCCGTGTTTAGTCAGGAGGGTGCACGTTGAAGCAGTGCCT
 1741 TGAAACTAGTTGTTATTTACAGAATCACAATATTATATAATCAAAAGAAAAGcTACAACA
 1801 CAACTGTGAATATAGGTTAAGAAGCTGCAGTAGCCAGTTCATCTTTCTCAGCTTACAGGA
 1861 CGATTTCTCGGATATGAATGAGTTCGCTATCGTTTTCCACTGTATACGCCGCCCTGTAA
 1921 CACCCCTAATGGGCTTATCTCCCAACTGTACCCATGGCGCTCTTTTTTGCTCTTTTAAAT
 1981 GTGCTTCATAAGCAAGTCTTCGTTTCGTAACACTCTTTGTTCTCAGAATACATCTGACAT

2041 GTATGTAACCATGACTTATGATTCCGATTCTTGTCCTTGCCTTGAATTC

Abb. 27: Schematische Darstellung der Subklone sowie DNA- und Proteinsequenz des isolierten Gens. A zeigt eine grobe Restriktionskarte des sequenzierten Gens sowie die Orientierung der sequenzierten Subklone. Die DNA und daraus abgeleitete Proteinsequenz ist in B abgebildet, wobei für die Darstellung der Proteinsequenz der Einbuchstaben-Kode gemäß der "IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature" verwendet wurde.

8.3.3 Northernblot-Analyse

Northernblot-Analysen mit dem 700 bp großen EcoRI Fragment (pEco) als Probe, sollten folgende zwei Fragen beantworten. Wie groß ist die RNA des isolierten Gens, und enthält das Gen eine intervenierende Sequenz. Um die zweite Frage zu beantworten wurde RNA aus dem Hefestamm J401 analysiert. Dieser Stamm ist eine temperatursensitive *rna2* Spleißmutante (Lin et al. 1985), der bei der restriktiven Temperatur von 36 °C Vorläufer-mRNAs akkumuliert. Deshalb wurde zunächst Gesamt-RNA aus einer Kultur, die bei der permissiven Temperatur (22 °C) gewachsen war, und aus einer parallel angesetzten Kultur, die für 1 Stunde bei der restriktiven Temperatur gewachsen war, isoliert. Aus beiden Gesamt-RNAs wurde Poly(A)+RNA angereichert, je 5 µg glyoxaliert und auf einem 1.2 % Agarosegel in 10 mM Na-Phosphat als Laufpuffer elektrophoretisiert (6 Std, 50 V / 15 cm). Die RNA wurde anschließend auf "Genescreen" übertragen, durch UV-Bestrahlung und Backen bei 80 °C auf dem Filter fixiert und 6 Std bei 42 °C vorhybridisiert. Das 700 bp große EcoRI Fragment (pEco) wurde durch die "random hexamer labeling"-Methode mit [³²P] radioaktiv markiert und als Probe für die Hybridisierung verwendet (42 °C, 12 Std). Die Filter wurden anschließend stringent gewaschen und 16 Std exponiert.

Abb. 28 zeigt das Autoradiogramm des Filters. In Spur 1 (M) ist ein radioaktiv markierter Längenmarker (ϕX174) aufgetragen, der genauso wie die RNA-Proben denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt worden war. In Spur 2 und 3 sind zwei verschiedene RNA-Präparationen aus Hefezellen, die bei der restriktiven Temperatur inkubiert worden waren, aufgetragen. In Spur 4 ist als Kontrolle RNA aus Hefezellen, die bei der permissiven Temperatur gewachsen waren aufgetragen. In allen drei Fällen wurde jeweils nur ein mRNA-Signal, das einer Größe von etwa 870 Nukleotiden entsprach gefunden. In keinem Fall konnte die Akkumulation einer Vorläufer-mRNA beobachtet werden. Dies bedeutet, daß dieses Gen sehr wahrscheinlich kein Intron besitzt.



Abb. 28: Northernblot-Analyse von Poly(A)⁺ RNA mit dem radioaktiv markierten EcoRI Fragment aus dem Plasmid pEco

Ca. 5 µg Poly(A)⁺RNA aus J401-Kulturen, die bei 22 °C (4) bzw. bei 36 °C (2 und 3) gewachsen waren, wurden glyoxaliert und auf einem 1.2 % Agarosegel in 10 mM Na-Phosphat-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt und auf "Genescreen"-Filter übertragen. Ein [³²P]-markierter ϕX174-Längenstandard wurde wie die RNA-Proben behandelt und in Spur 1 aufgetragen. Als Hybridisierungsprobe wurde das [³²P]-markierte 700 bp große EcoRI Fragment aus pEco verwendet. Nach stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen ergab sich nach 16 Std Exposition das gezeigte Autoradiogramm.

8.3.4 Computeranalysen der DNA- und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz

Ausgehend von der Primärsequenz der DNA wurde mit Hilfe des Computerprogrammes "MAP" die Aminosäuresequenz des isolierten Gens ermittelt (Abb. 27). Es existiert ein durchgehender Leserahmen, der mit dem für Methionin kodierenden AUG-Triplett bei Position 891 startet. Nach 240 Aminosäuren findet sich das erste UAG-Stopkodon, an das sich mehrere Polyadenylierungsstellen anschließen.

Computeranalysen der DNA-Sequenz mit bekannten und veröffentlichten DNA-Sequenzen ergaben nur zufällige, statistisch auftretende Homologien zu den verschiedensten Sequenzen. Aus diesem Grund wurde die ermittelte Proteinsequenz des isolierten Gens mit der zur Zeit größten Proteindatenbank "MIPSX" mittels des "FASTP"-Programmes verglichen. Das Ergebnis dieser Computeranalyse, sowie die Parameter der Suche sind in Abb. 29 wiedergegeben. Auffallend ist dabei die ungewöhnlich hohe Homologie zum ribosomalen Protein S1 von *Xenopus laevis*. Diese Homologie, die innerhalb von 70 Aminosäuren 60 % Identität aufzeigt, dürfte durchaus signifikant sein, und es ist deshalb möglich, daß es sich bei dem klonierten Gen um ein bisher nicht charakterisiertes ribosomales Protein, das dem ribosomalen Protein S1 von *Xenopus laevis* entspricht, handelt.

rib.seq, 240 amino acids vs /mnt1/seq/mipsx.seq library
 4037720 residues in 16526 sequences
 mean score: 20.7 (5.94)
 1000 scores better than 30 saved
 ktup: 2
 fact: 8
 scan time: 0:01:10.99

The best scores are:..... init, opt
 >F1;A09047 : R3XL1 30S ribosomal protein S1 - African claw 183, 213
 >F1;A07337 : GWEBT Indole-3-glycerol phosphate synthase (E 60, 65
 >P1;A06474 : DELVN4 Gene ndh4 protein, NADH-ubiquinone oxi 59, 59
 >P1;A06473 : DENTN4 Gene ndh4 protein, NADH-ubiquinone oxi 59, 59
 >P1;A07336 : GWEC Indole-3-glycerol phosphate synthase (EC 59, 64
 >P1;J02467 : G03205c E. coli trp operon with the genes trp 59, 64
 >P1;G05730 : TRPC\$ECOL INDOLE-3-GLYCEROL PHOSPHATE SYNTHAS 59, 64
 >P1;G05120 : RPOB\$SALT DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE (EC 2.7 52, 59
 >P1;J02319 : G03079 E. coli gene rpoB fragment encoding th 50, 57
 >P1;H06238 : 180K protein (readthrough) - Tobacco mosaic v 50, 64

60.0% identity in 70 aa overlap

```

1' MVALISKRRKLVDAGVFYAELENEFFTRELAEEGYSGVEVRVTPKTEVIRATRTQDVLG
61' ENGRINELTLLVQKRFKYAPGTIVLYAERVQDRGLSGVAQAESMKFKLLNGLAIRRAAY
      |
121' GVVRYVMESGAKGCEVVVSGKLRAARAKAMKFADGFLIHSGQPVNDFIDTATRHVLMRQG
      .....
1"   RRWKERVVRSSCLETTKPRAKSMKFVDGLMIHSGDPVNYVYVDTAVRHVLLRQG
      |
      |
181' VLGIKVKIM--RDPKASRTGPKALPDVAVTIEPKKEEPI LAPSVKDYRPAEETEAQAEPV
      ..... :. . . :. . . :. . .
54" VLGIKVKIMLPKDPGKIGPKKPLPDHVAFFSPRMLRCQPFFLSRREQSLISHSPSCH
      |
239' EA
114" GLLPQHNGLVKT

```

Abb. 29: Vergleich der ermittelten Proteinsequenz des klonierten Gens mit der Proteindatenbank MIPSX
 Die ermittelte Proteinsequenz des isolierten Gens (240 Aminosäuren) wurde mittels des "FASTP"-Programmes mit der Proteindatenbank MIPSX mit den oben angegebenen Parametern verglichen. Die beste gefundene Homologie zum ribosomalen Protein S1 von *Xenopus laevis* ist außerdem durch direkte Aminosäure-gegenüberstellung gezeigt.

Um zu prüfen ob dieses Gen tatsächlich für ein ribosomales Protein kodiert, soll zu einem späteren Zeitpunkt das in vitro Translationsprodukt der diesem Gen entsprechenden mRNA, zusammen mit isolierten ribosomalen Proteinen, zweidimensional elektrophoretisch aufgetrennt und auf gleiches Laufverhalten analysiert werden. Die im Promotorbereich vieler ribosomaler Protein-Gene gefundenen konservierten Sequenzen "Homol1"

(AACATC^C/_TG/_AT^A/GCA) bzw. "RPG-Box" (ACCATACAT^T/_CT/_A; Teem et al., 1984; Leer et al., 1985) waren in der hier sequenzierten Promotorregion nicht zu finden.

Zukünftige "Gen-Disruptionsexperimente" und die erwähnte zweidimensionalen Gelelektrophorese des in vitro Translationsproduktes sollen deshalb klären, ob dieses Gen essentiell ist, und ob es sich tatsächlich um ein bisher nicht charakterisiertes ribosomales Protein von *Saccharomyces cerevisiae* handelt.

LEBENS LAUF

Name: Karl Erich Köhrer
Geburtsort: Günzburg
Geburtsdatum: 12. Dezember 1958

Schul Ausbildung

09/1965 - 07/1969 Grundschule Reisensburg

09/1969 - 06/1978 Dossenberger Gymnasium Günzburg
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium

11/1978 - 11/1985 Biologiestudium an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg

11/1980 Diplom-Vorprüfung

02/1985 Diplom-Hauptprüfung in den Fächern Mikrobiologie,
Zoologie, Biochemie und Humangenetik

08/1983 - 02/1985 Diplomarbeit unter Anleitung von Frau Prof. Dr.
I. Grummt am Biochemischen Institut der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg.
Thema: Untersuchungen zur Promotoraktivität einer
neuen Familie mittel-repetitiver DNA-Sequenzen (LTR-
IS) des Mäusegenoms.

seit 04/1985 Doktorarbeit unter Anleitung von Herrn Dr. H. Domdey
am Genzentrum der Universität München.
Thema: Das *MATa1* Gen der Hefe *Saccharomyces*
cerevisiae: Untersuchungen der Spleißreaktion und
der möglichen Rolle und Funktion der Introns.

07/1985 - 06/1987 Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen
Volkes

